



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR**

REGIANNE MACIEL DOS SANTOS CORREA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E
GENOTÓXICOS DO ANTIFÚNGICO FLUCONAZOL EM LINHAGEM
DE RIM DE MACACO VERDE AFRICANO (VERO)**

**BELÉM
2018**

REGIANNE MACIEL DOS SANTOS CORREA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E
GENOTÓXICOS DO ANTIFÚNGICO FLUCONAZOL EM LINHAGEM
DE RIM DE MACACO VERDE AFRICANO (VERO)**

Tese de Doutorado apresentada como requisito para
obtenção de título de Doutor (a) pelo Programa de Pós-
Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área
de Concentração Biologia Celular da Universidade
Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia.

**BELÉM - PA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C824a Correa, Regianne Maciel dos Santos.
 AVALIAÇÃO IN VITRO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO ANTIFÚNGICO
 FLUCONAZOL EM LINHAGEM DE RIM DE MACACO VERDE AFRICANO (VERO) / Regianne
 Maciel dos Santos Correa. — 2018.
 73 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia
 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (), Instituto de
 Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
1. Fluconazol. 2. Citotoxicidade e Genotoxicidade. 3. Teste do Cometa. 4. Teste do Micronúcleo. 5.
 EROS. I. Título.

CDD 571.6

REGIANNE MACIEL DOS SANTOS CORREA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Doutor (a) em Neurociências e Biologia celular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia.

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia
Professor da Universidade Federal do Pará – UFPA
Orientador

Prof. Dr. André Salim Khayat
Professor da Universidade Federal do Pará – UFPA
Membro

Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha
Professor do Instituto Federal do Pará – IFPA
Membro

Prof. Dra. Edilene Oliveira da Silva
Professora da Universidade Federal do Pará – UFPA
Membro

Prof^a. Dra. Adriana Costa Guimarães
Professora da Universidade Federal do Pará – UFPA
Suplente

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES

- Universidade Federal do Pará (UFPA), Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e Laboratório de Citogenética Humana (LCH).



FONTES FINANCIADORAS

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



Dedico este trabalho ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia pela dedicação, comprometimento e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Quando decidi ingressar em uma Pós-graduação, eu sabia que não seria fácil, assim, tudo que pedi à Deus naquele momento foi que Ele estivesse sempre comigo e assim, a minha fé fez com que eu acreditasse que tudo é possível, e guardei comigo esta mensagem “Porque para Deus todas as coisas são possíveis” (Mateus 19:26). Obrigada Deus pelas bênçãos alcançadas. Mas tudo começou a partir de um sonho, em me tornar professora e pesquisadora. Daí conheci o LCH (Laboratório de Citogenética Humana) onde eu tive o privilégio de conhecer pesquisadores engajados nos estudos e pesquisas. Neste momento escolhi ficar porque vi um cenário de dedicação e comprometimento de muito trabalho, e assim, dispostos a fazer a diferença em um país que não prioriza a pesquisa e a educação. Foi quando um dia, Marcelo Bahia, me afirmou esta realidade, que fazer pesquisa não é fácil (acho que ele estava me testando para saber se eu queria mesmo pesquisar). Hoje ele é o culpado de tudo ter dado certo, pois me ensinou os primeiros passos na pesquisa desde o mestrado até aqui no doutorado. Obrigada pelos seus ensinamentos e “paiciência”. Outras pessoas também foram importantes para a realização deste estudo, assim, quero agradecer a participação e colaboração da prof.^a Dra. Adriana Guimarães, Prof.^a Dra. Tatiane Cristina, MSc. Laís Bonfim, juntamente com prof. Dr. Rommel Burbano, que também através deles, adquiri conhecimento, e por isso, eu os admiro pela grande contribuição de seus estudos, apresentados à nossa comunidade científica, acadêmica e sociedade. Tenho um grande orgulho de fazer parte deste grupo de pesquisadores do LCH, e por este motivo, foi possível a conclusão desta tese de doutorado, que nos rendeu a publicação em revista internacional. Estou muito feliz por isso. Também desde já quero agradecer a participação da banca avaliadora composta pelos professores, Dr. André Khayat, Dr. Carlos Rocha e Dra. Edilene Oliveira que certamente farão grandes contribuições para melhoria deste trabalho. Também quero agradecer ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular – PPNBC na qual ingressei desde o mestrado até o doutorado com bolsa de estudo concedida pela CAPES. Mas nada seria possível se não fosse a participação da minha família, meus pais, Reginaldo e Rosa, que são meus eternos tutores nesta vida, que acreditam em mim, na minha dedicação. Meus irmãos, Reginaldo e Renan pelo cuidado e paciência, porque eu sou a irmã mais velha. E ao meu marido Ivan, que tem sido meu companheiro de lutas, conquistas e vitórias, cuidado e amor pela nossa família e ao meu filho Felipe que foi compreensivo nos momentos que estive ausente e por ser um bom filho. Estes são meus sinceros agradecimentos e que Deus os abençoe.

“Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito de baixo do
céu...Tempo de plantar e tempo de colher”

(Eclesiastes 3:1)

RESUMO

O Fluconazol é um antifúngico triazólico de amplo espectro que é bem estabelecido como tratamento de primeira linha para infecções por *Candida albicans*. Apesar de seu uso extensivo, os relatos sobre seus efeitos genotóxicos / mutagênicos são controversos, portanto, mais estudos serão necessários para melhor esclarecimento de tais efeitos. Células de rim de macaco verde africano (Vero) foram expostas *in vitro* a diferentes concentrações de Fluconazol e foram avaliadas quanto a diferentes parâmetros, tais como: citotoxicidade (ensaio MTT e morte celular por corantes fluorescentes), genotoxicidade / mutagenicidade (teste do cometa e teste do micronúcleo) e indução de estresse oxidativo (ensaio do DCFH-DA). O Fluconazol foi utilizado nas concentrações de 81,6; 163,2; 326,5; 653; 1.306 e 2.612,1µM para o ensaio do MTT e 81,6; 326,5 e 1.306µM para os demais ensaios. Os resultados do MTT mostraram que a viabilidade celular diminuiu à partir da concentração de Fluconazol de 1.306µM (85,93%), sendo estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na concentração de Fluconazol de 2.612,1µM (35,25%), em comparação com o controle (100%). O Fluconazol também induziu necrose ($P < 0,05$) quando as células foram expostas às concentrações de 81,6; 326,5 e 1.306µM para ambos os tempos de tratamento testados (24 e 48h) em comparação com o controle negativo. Com relação à genotoxicidade / mutagenicidade, os resultados mostraram que o Fluconazol aumentou significativamente ($P < 0,05$) o índice de dano ao DNA, avaliado pelo ensaio do cometa, à 1.306µM (ID = 1,17) em comparação ao controle negativo (ID = 0,28). A frequência de micronúcleos também aumentou até atingir significância estatística ($P < 0,05$) em 1.306µM de Fluconazol (com 42MN / 1000 células binucleadas) em relação ao controle negativo (13MN / 1000 células binucleadas). Finalmente, a formação significativa ($P < 0,05$) de espécies reativas de oxigênio foi observada em 1.306µM de Fluconazol (DO = 40,9), em comparação ao controle negativo (DO = 32,3). Nossos resultados mostraram que o Fluconazol foi citotóxico e genotóxico nas condições avaliadas. É provável que tais efeitos possam ser devidos às propriedades oxidativas do Fluconazol e / ou à presença de FMO (Flavina monoxigenase) em células Vero.

Palavras-chave: Fluconazol. Genotoxicidade. Citotoxicidade. Teste do Micronúcleo. Teste do Cometa. EROS.

ABSTRACT

Fluconazole is a broad-spectrum triazole antifungal that is well-established as the first-line treatment for *Candida albicans* infections. Despite its extensive use, reports on its genotoxic/mutagenic effects are controversial; therefore, further studies are needed to better clarify such effects. African green monkey kidney (Vero) cell line were exposed *in vitro* to different concentrations of Fluconazole and were then evaluated for different parameters, such as cytotoxicity (MTT/cell death by fluorescent dyes), genotoxicity/mutagenicity (comet assay/micronucleus test), and induction of oxidative stress (DCFH-DA assay). Fluconazole was used at concentrations of 81.6, 163.2, 326.5, 653, 1306, and 2612.1 μM for the MTT assay and 81.6, 326.5, and 1306 μM for the remaining assays. MTT results showed that cell viability reduced upon exposure to Fluconazole concentration of 1306 μM (85.93%), being statistically significant ($P < 0.05$) at Fluconazole concentration of 2612.1 μM (35.25%), as compared with the control (100%). Fluconazole also induced necrosis ($P < 0.05$) in Vero cell line when cells were exposed to all concentrations (81.6, 326.5, and 1306 μM) for both tested harvest times (24 and 48 h) as compared with the negative control. Regarding genotoxicity/mutagenicity, results showed Fluconazole to increase significantly ($P < 0.05$) DNA damage index, as assessed by comet assay, at 1306 μM versus the negative control (DI=1.17 vs DI=0.28, respectively). Micronucleus frequency also increased until reaching statistical significance ($P < 0.05$) at 1306 μM Fluconazole (with 42MN/1000 binucleated cells) as compared to the negative control (13MN/1000 binucleated cells). Finally, significant formation of reactive oxygen species ($P < 0.05$) was observed at 1306 μM Fluconazole vs the negative control (OD=40.9 vs OD=32.3, respectively). Our experiments showed that Fluconazole is cytotoxic and genotoxic in the assessed conditions. It is likely that such effects may be due to the oxidative properties of Fluconazole and/or the presence of FMO (flavin-containing monooxygenase) in Vero cells.

Key Words: Fluconazole. Genotoxicity. Cytotoxicity. Micronuclei. Comet assay. ROS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do Fluconazol.....	16
Figura 2 -	Formação de cristais de formazan a partir do sal de tetrazólio MTT.....	29
Figura 3 -	Fotomicrografias ilustrando células binucleadas micronucleadas (coradas com Giemsa).....	32
Figura 4 -	Padrão de escores utilizados para determinação do índice de dano no teste do cometa.....	35
Figura 5 -	Princípio do mecanismo de funcionamento do DCFH-DA para determinação de ERO no meio intracelular.....	36
Figura 6 -	Efeito do Fluconazol em células VERO analisado pelo ensaio do MTT.....	40
Figura 7 -	Frequência de micronúcleos observada em células VERO após exposição à diferentes concentrações de Fluconazol por 24h.....	41
Figura 8 -	Efeitos do Fluconazol em células VERO analisadas pelo ensaio do cometa.....	43
Figura 9 -	Geração de ERO induzida pelo Fluconazol em células VERO.....	44
Figura 10 -	Porcentagem de morte celular induzida pelo Fluconazol em células VERO e analisada por coloração fluorescente diferencial.....	45
Figura 11 -	Células VERO após o tratamento com Fluconazol e a realização do ensaio de apoptose e necrose por marcação fluorescente diferencial.....	45

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Classificação em cinco categorias de danos no DNA de acordo com a intensidade relativa da cauda do cometa.....	35
Tabela 2 - Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese (IPBC) observado em células VERO após exposição de diferentes concentrações de Fluconazol.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS -	Acquired Immunodeficiency Syndrome
BCRJ -	Banco de Células do Rio de Janeiro
CAT -	Catalase
CtB -	Citocalasina-B
DCF -	2'7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA -	2'7'-diclorofluoresceína diacetato
DMEM -	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DNA -	Deoxyribonucleic Acid
DO -	Densidade óptica
ERO -	Espécie Reativa de Oxigênio
FDA -	Diacetato de Fluoresceína
FDA -	Food and Drug Administration
FMO -	Flavina Monoxigenase
GSH -	Glutathiona Reduzida
GSH-Px -	Glutathiona-peroxidase
GSH-Rd -	Glutathiona-redutase
ID -	Índice de Dano
IDN -	Índice de Divisão Nuclear
IPBC -	Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese
MN -	Micronúcleo
MTT -	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NMU -	N-Nitroso-N-Methylurea
OMS -	Organização Mundial da Saúde
SBF -	Soro Bovino Fetal
SCGE -	Single Cell Gel Electrophoresis
SOD -	Superóxido-dismutase
UV -	Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 FLUCONAZOL.....	15
1.2 METABOLISMO E TOXICIDADE DO FLUCONAZOL.....	16
1.3 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE.....	18
1.4 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
1.5 LINHAGENS CELULARES COMO MODELO DE ESTUDO E A LINHAGEM VERO.....	22
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 FLUCONAZOL.....	27
3.2 LINHAGEM CELULAR.....	27
3.3 CULTIVO DAS LINHAGENS.....	28
3.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	28
3.4.1 Princípio da Técnica.....	28
3.4.2 Procedimento Experimental.....	29
3.5 TESTE DO MICRONÚCLEO.....	30
3.5.1 Princípio da Técnica.....	30
3.5.2 Procedimento Experimental.....	30
3.5.3 Critérios para a Seleção das Células.....	31
3.5.4 Análise dos Micronúcleos.....	32
3.5.5 Análise do Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC).....	32
3.6 ENSAIO DO COMETA (VESÃO ALCALINA).....	32
3.6.1 Princípio da Técnica.....	32
3.6.2 Preparo das Lâminas.....	33
3.6.3 Eletroforese.....	34
3.6.4 Coloração.....	34
3.6.5 Análise das Lâminas.....	34
3.7 ENSAIO DO DICLORODIHIIDROFLUORESCEÍNA-DIACETATO (DCFH-DA).....	36
3.7.1 Princípio da Técnica.....	36

3.7.2 Procedimento Experimental.....	36
3.8 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE UTILIZANDO COLORAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL COM HOECHST 33342 / IODETO DE PROPÍDEO (PI) / DIACETATO DE FLUORESCEÍNA (DAF).....	37
3.8.1 Princípio da Técnica.....	37
3.8.2 Procedimento Experimental.....	38
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	40
4.2 TESTE DO MICRONÚCLEO.....	40
4.3 TESTE DO COMETA.....	42
4.4 GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	43
4.5 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE UTILIZANDO COLORAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL COM HOECHST 33342 / IODETO DE PROPÍDEO (PI) / DIACETATO DE FLUORESCEÍNA (DAF).....	44
5 DISCUSSÃO.....	46
6 CONCLUSÃO.....	52
7 REFERÊNCIAS.....	53

ANEXO – ARTIGO: Cytotoxic and Genotoxic Effects of Fluconazole on African Green Monkey Kidney (Vero) Cell Line.

1 INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas invasivas constituem cada vez mais um importante problema de saúde pública devido ao crescimento de populações imunodeficientes, ao desenvolvimento de antifúngicos resistentes e limitações na eficácia e toxicidade dos antifúngicos atuais (CALUGI; TRABOCCHI; GUARNA, 2011). O tratamento de tais infecções tem demonstrado ser bastante limitado por problemas relacionados com a segurança, resistência e eficácia do fármaco utilizado. Atualmente, a terapia usada no tratamento de micoses invasivas conta com poucos fármacos, tais como: a anfotericina B, o itraconazol e o Fluconazol (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

O Fluconazol é o composto mais conhecido entre os triazóis, pois é uma alternativa terapêutica habitual no tratamento de infecções fúngicas sistêmico-específicas (FICA, 2004). Esta droga exerce atividade sobre várias espécies de fungos causadores de micoses profundas e mucocutâneas, tendo amplo espectro de ação, incluindo espécies como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e várias espécies de *Candida* (NETO; DE CASTRO, 1996; KOROLKOVAS, 2003).

O Fluconazol é bem estabelecido como a primeira linha de tratamento das infecções sistêmicas de *Candida albicans* (GOA; BARRADELL, 1995), sendo uma importante droga nas áreas da obstetrícia e ginecologia para o tratamento de candidíase vaginal. É também utilizado em pacientes com a imunidade comprometida, tais como os portadores de AIDS e pacientes com neutropenia devido a quimioterapia para o câncer. Tais pacientes apresentam um risco particular de desenvolver infecções por *Candida albicans* que podem tornar-se sistêmicas (MCCULLOUGH; ROSS; READE, 1996; VAZQUEZ, 1999).

No entanto, apesar de sua importância, existem relatos de casos de efeitos teratogênicos em recém-nascidos e embriotóxicos em animais após utilização da droga e sua passagem para o leite materno (CATALÁN; MONTEJO, 2006; MENEGOLA et al., 2004; TIBONI, 1993). Para Embiruçu et al. (2005), os teratógenos constituem agentes ambientais, químicos, físicos e biológicos, que podem causar anormalidades obstétricas e (ou) fetais. A ação teratogênica sobre o embrião ou feto em desenvolvimento depende de diversos fatores, destacando-se o estágio de desenvolvimento do conceito, a relação entre dose e efeito, genótipo materno fetal e mecanismo patogênico específico de cada agente (SCHÜLER-FACCINI et al., 2002). O estudo das ações das drogas sobre diversas fases do processo reprodutivo visa detectar os efeitos da fertilidade, transporte, embriogênese e organogênese, parto e recém-nascido. O risco teratológico existe durante todo período gestacional, no entanto é maior na fase de

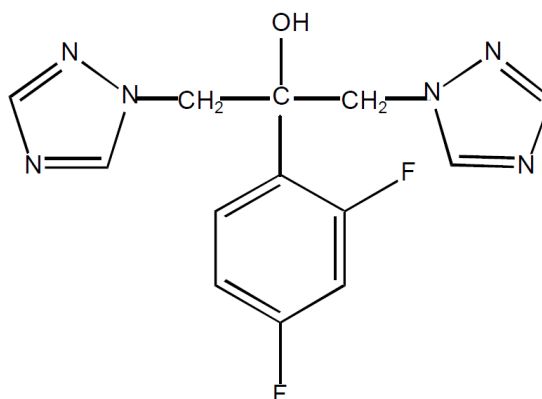
embriogênese, quando ocorrem a diferenciação tecidual e organogênese. É ainda possível que o desenvolvimento no período pós-natal possa sofrer alterações estruturais e metabólicas, a custa de substâncias utilizadas no período pré-natal. A embriotoxicidade se refere à perturbação no desenvolvimento embrionário ou fetal, a custa de dosagens que não afetam o organismo materno (RODRIGUES et al., 2011).

Devido ao Fluconazol ser a única substância triazólica excretada quase que totalmente pelo rim, as doses devem ser ajustadas em pacientes com deficiência renal (FICA, 2004). Apesar disto, a resposta clínica a este fármaco pelos pacientes com candidíase é bastante satisfatória, podendo, no entanto, haver recaídas devido a uma incompleta eliminação das células fúngicas nos pacientes tratados. Assim, o antifúngico ideal para o futuro deve apresentar um grande espectro de atividade fungicida, possuindo um mecanismo de ação que limite a toxicidade no hospedeiro. Ou seja, um antifúngico capaz de eliminar as células fúngicas, sem prejudicar as células humanas (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Neste sentido, é importante que se conheça os efeitos celulares citotóxicos e genotóxicos do Fluconazol para que se possa ter mais subsídios para a utilização segura deste medicamento.

1.1 FLUCONAZOL

O Fluconazol (2-(2,4-difluorophenyl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-propanol) é um antifúngico triazólico do grupo dos azóis, sendo um composto sintético contendo três átomos de nitrogênio no anel azol (Figura 1) (GROPPELLI et al., 2007). Este antifúngico tem amplo espectro e é usado para tratar infecções causadas por fungos patogênicos diversos (NETO; DE CASTRO, 1996). O Fluconazol, assim como outros azóis, tem como mecanismo de ação a inibição da enzima oxidativa lanosterol 14- α -desmetilase, associada ao citocromo P450 (CYP) [CYP3A4 e CYP2C9]. A inibição desta enzima bloqueia a conversão de lanosterol a ergosterol, um componente da membrana celular fúngica, essencial na bioregulação da fluidez, assimetria e integridade da membrana celular. Como resultado, observa-se uma alteração na permeabilidade da membrana das células fúngicas e consequente acúmulo de peróxido de hidrogênio, o que danifica a estrutura das organelas celulares do fungo (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

Figura 1 – Estrutural química do Fluconazol.



Fonte: CORRÊA et al. (2012).

1.2 METABOLISMO E TOXICIDADE DO FLUCONAZOL

O Fluconazol é a primeira geração de triazóis disponível na década de 90. É altamente solúvel e disponível na formulação oral e intravenosa. A via oral é reservada para os casos mais leves e para terapêutica de manutenção a longo prazo. Após a administração de 50mg/dia por via oral, níveis séricos de 1,0 mg/l são obtidos após 2 horas (MAERTENS, 2004). Fluconazol por via oral é também utilizado no tratamento de micoses sistêmicas tendo como tempo médio no sangue 30 horas, com dose-hora de 400 mg ao dia (FICA, 2004). A dose recomendada para o tratamento de infecções graves em adultos com função renal normal é de 200 a 400 mg/d. A duração do tratamento vai depender da natureza e da gravidade do processo (NETO; DE CASTRO, 1996).

Uma característica importante do Fluconazol é sua boa penetração no sistema nervoso central. Níveis da droga no líquido cefalorraquidiano representam 50 a 90% da concentração sérica concomitante. É o único fármaco triazólico que é excretado inalterado na urina, tornando-se o tratamento de escolha para infecções do trato urinário (MAERTENS, 2004). Cerca de 80% da dose administrada é eliminada de forma ativa pelos rins e sua vida média no soro é prolongada na vigência de insuficiência renal, o que obriga a ajustes posológicos nestas circunstâncias (COLOMBO et al., 2002).

O Fluconazol é utilizado na clínica para profilaxia e tratamento de candidíases orofaríngeas e esofágicas em pacientes com AIDS, assim como em pacientes neutropênicos, ou que passaram por procedimentos cirúrgicos e desenvolveram candidíase invasiva (LOEFFLER;

STEVENS, 2003). Este composto é utilizado como medicamento na quimioprofilaxia secundária de pacientes com meningite criptocócica (TAPIA et al., 2003). O amplo uso do Fluconazol na clínica tem como resultado uma mudança na microbiota hospedeira para espécies resistentes a esses agentes antifúngicos (LOEFFLER; STEVENS, 2003). Essa mudança leva à seleção de micro-organismos resistentes e favorece infecções por *Candida non-albicans*, como *Candida glabrata*, que é intrinsicamente menos suscetível ao Fluconazol (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Os pacientes com AIDS são os maiores acometidos por infecções orofaríngeas causadas por *C. glabrata* resistentes ao Fluconazol e isso ocorre por que esses pacientes apresentam imunodepressão e prolongada exposição aos azólicos (LOEFFLER; STEVENS, 2003; MASIÁ CANUTO et al., 2000). O Fluconazol é também bem tolerado e amplamente utilizado em dose única de 150 mg para o tratamento de candidíase vaginal. No entanto, em muitos casos este antifúngico apresenta uma série de efeitos colaterais como náuseas, dor de cabeça, erupção cutânea, dor abdominal, vômitos e diarreia. A incidência global destes efeitos adversos foi de 16% entre 4000 pacientes tratados com Fluconazol (GRANT; CLISSOLD, 1990).

O uso de Fluconazol durante a gestação de animais e seres humanos tem sido largamente investigado. Estudos têm mostrado o potencial teratogênico desta droga quando administrada pela via oral em doses mais altas em ratas grávidas. A administração desta droga em doses que variam de 80 mg/kg a 320 mg/kg a ratas grávidas (20 - 60 vezes a dose recomendada para o homem) resultou em malformação fetal e embrioletalidade (PURSLEY et al., 1996). Pursley et al. (1996) relataram anomalias fetais no tratamento com Fluconazol de coccidioidomicose em 400 mg/dia e 800 mg/dia durante a gestação. Van Cauteren et al. (1990) demonstraram em animais *in vivo* que altas doses de Fluconazol podem ser teratogênicas induzindo defeitos craniofaciais. Por fim, o Fluconazol produziu efeito teratogênico na concentração de 500µM, interferindo no mecanismo celular e molecular em culturas embrionárias de ratos *in vitro* (MENEGOLA et al., 2003), em embrião de ratos (MENEGOLA et al., 2004) e no aparelho branquial (TIBONI, 1993).

No que diz respeito a gestação em seres humanos, existem na literatura alguns relatos de casos de crianças diagnosticadas com má formação congênita após o tratamento materno prolongado com doses elevadas de Fluconazol durante o primeiro trimestre de gravidez. As anomalias relatadas foram características dismórficas, fenda palatina e anomalias esqueléticas (ALECK; BARTLEY, 1997; LEE, FEINBERG, ABRAHAM, 1992; LOPEZ-RANGEL; VAN ALLEN, 2005; PURSLEY et al., 1996).

A avaliação de qualquer agente antifúngico azólico potencialmente teratogênico é importante, pois mulheres grávidas são mais susceptíveis a candidíase vaginal (SOBEL, 2007) que é a indicação clínica mais comum para estes fármacos. O Fluconazol é reconhecido como um agente teratogênico desde 1992, no entanto, ainda é frequentemente utilizado durante a gravidez (FIRTH; HUGHES, 2014). Por conta de sua teratogenicidade, o Fluconazol é classificado pelo FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) como Categoria C na gravidez (estas drogas devem ser usadas durante a gravidez somente se o benefício justificar o risco para o feto) (AMARAL; NUNES, 2008).

1.3 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE

A genética toxicológica (que estuda a genotoxicidade) é uma especialidade que se ocupa da identificação e estudo da ação de qualquer agente físico, químico ou biológico capaz de produzir efeitos deletérios sobre o organismo, com especificidade no material genético (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003). O DNA é constantemente exposto a uma variedade de substâncias genotóxicas tanto por fontes endógenas, a exemplo de subprodutos metabólicos do organismo, como por fontes exógenas, como por exemplo a radiação ultravioleta (UV) (ERMOLAEVA; SCHUMACHER, 2014).

O estudo da genotoxicidade representa um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos (KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002) devendo ser realizado nos estágios iniciais deste desenvolvimento, a fim de fornecer prognósticos a respeito de um possível potencial genotóxico e/ou carcinogênico e para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas (SNYDER; GREEN, 2001). Segundo o Departamento de Saúde e Serviços Humanos de Alimentação e Administração de Drogas dos Estados Unidos (FDA), produtos farmacêuticos cuja expectativa de uso clínico seja contínua por pelo menos seis meses, devem ser submetidos obrigatoriamente a testes de genotoxicidade, bem como produtos farmacêuticos utilizados de forma intermitente no tratamento para condições crônicas (BRAMBILLA et al., 2013).

Os agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente por possuírem habilidades de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Desta forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992). Quando as células são expostas a agentes que lesam o DNA, genes críticos podem ser danificados, a exemplo o p53 que atua na parada do ciclo celular promovendo um atraso para promover o tempo destinado ao reparo do dano antes da síntese

replicativa do DNA. Uma disfunção nesses genes e falhas no reparo resultam na replicação de lesões mutagênicas que, em acúmulo, favorecem mudanças genéticas, incluindo transformações neoplásicas (BARTKOVA et al., 2005; VALKO et al., 2007).

Assim, a avaliação da genotoxicidade é essencial para a segurança de todos os tipos de substâncias, que vão desde produtos farmacêuticos, produtos químicos industriais, pesticidas, biocidas, aditivos alimentares, cosméticos, ingredientes para medicamentos veterinários, entre outros, sendo relevante no contexto de legislações internacionais que visam à proteção da saúde humana e saúde animal (CORVI et al., 2013).

Os testes de detecção de genotoxicidade incluem aqueles que avaliam danos primários ao DNA, que podem ser reparados, ou seja, reversíveis, bem como danos estáveis e irreversíveis que são transmissíveis para a geração seguinte quando ocorre em células germinativas (CORVI; MADIA, 2017).

O teste do cometa, ou eletroforese em gel de célula única (SCGE), foi introduzido pela primeira vez em 1984 para a visualização direta de danos no DNA em células individuais. Este ensaio é um método valioso para a detecção de mutações e defeitos no reparo do material genético de qualquer célula eucariótica (HAGIWARA et al., 2006; KLEINSASSER et al., 2004; FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

O teste de micronúcleo é uma ferramenta amplamente utilizada para avaliar a mutagenicidade de muitas substâncias (FENECH et al., 1999), sendo utilizado para avaliar a capacidade de uma substância em quebrar cromossomos (efeito clastogênico) ou afetar a formação do fuso mitótico, o que pode levar à distribuição desigual de cromossomas durante a divisão celular (efeito aneugênico) (MACGREGOR et al., 1987). Devido sua confiabilidade e sua reprodutibilidade, o teste do micronúcleo tornou-se um dos padrões de técnicas citogenéticas para testes de toxicologia genética em células humanas e de mamífero em geral (FENECH, 2000; THIERENS; VRAL, 2009).

Relatos sobre os efeitos genotóxicos / mutagênicos do Fluconazol são controversos. Por exemplo, Yüzbaşıoğlu et al. (2008) avaliaram o efeito do Fluconazol em células da medula óssea de ratos *in vivo* (através do teste de aberração cromossômica) e em linfócitos humanos *in vitro* (através do teste de aberração cromossômica, troca de cromátides irmãs e no teste de micronúcleo). O Fluconazol não aumentou a frequência de aberrações cromossômicas no teste *in vivo*. Já no teste *in vitro*, o antifúngico induziu significativamente aberrações cromossômicas e altas frequências de micronúcleos em comparação ao controle negativo. De acordo com estes resultados, o Fluconazol é clastogênico e aneugênico para linfócitos humanos.

No entanto, outro estudo *in vivo* utilizando ratos, demonstrou que o Fluconazol tem a capacidade de aumentar a frequência de aberrações cromossômicas, principalmente quebras, indicando que o antifúngico agiu, nestas condições, possivelmente após a duplicação cromossômica na fase G2 do ciclo celular (BISWAS; PATHAK; KHUDA-BUKHSH, 2004).

Por fim, Fucic et al. (2008) foram os primeiros a demonstrar que existe uma quimio-sensibilidade relacionada a idade no que diz respeito aos efeitos genotóxicos do Fluconazol. Estes autores observaram que, após exposição ao antifúngico (a uma dose de 12mg/kg), os animais jovens e recém-nascidos mostraram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em comparação aos animais adultos e a frequência de micronúcleos permaneceu elevada duas semanas após a exposição.

1.4 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Um radical livre pode ser um átomo ou uma molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados, isto é, tem orbitais com apenas um elétron (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2006). Sob esta forma, o composto apresenta uma forte reatividade com a maioria das espécies químicas. Os radicais livres derivados de oxigênio são genericamente conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) e representam a classe mais importante de radicais livres geradas pelo organismo (MILLER; BUETTNER; AUST, 1990). Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (VALKO et al., 2007).

Em concentrações baixas ou moderadas, as ERO podem ser benéficas para a célula, estando envolvidas em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação (FRIDOVICH, 1999), por exemplo: controle da pressão sanguínea, apoptose, fagocitose de agentes patogênicos, fertilização de óvulos e ativação de genes (BERLETT; STADTMAN, 1997; VASCONCELOS et al., 2007). No entanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes pode ser alterado, seja devido a uma produção excessiva de ERO ou porque existe uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula (MACHLIN; BENDICH, 1987). A este desequilíbrio chamamos estresse oxidativo e nestas situações as ERO em excesso podem oxidar e danificar lipídeos celulares, proteínas e DNA, levando à sua modificação e frequentemente à sua inutilização, inibindo a sua função normal (RIDNOUR et al., 2005; VALKO et al., 2007). Este efeito danoso nos substratos biológicos

pode afetar a saúde humana. Por exemplo, se a cadeia do DNA é quebrada devido a um estresse oxidativo, ela pode ser reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Assim, podemos observar que apesar do oxigênio molecular (O_2) ser essencial para a vida aeróbia, pode ser tóxico em determinadas condições (GILBERT, 2006).

O estresse oxidativo tem ainda grande importância no processo de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos outros processos patológicos além do câncer, tais como: doenças auto-imunes, cardiopatias, doenças do pulmão, hipertensão arterial sistêmica, Alzheimer, Parkinson, estados tóxicos causados por álcool, fumo, e entre outros (JACOB et al., 2013).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidantes para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (SIES, 1993). Em condições normais, as células produzem mecanismos de defesa endógena e exógena que estão envolvidos na detoxificação celular, neutralizando as ERO e prevenindo o estresse oxidativo (ALLEMAN; BAUMANN, 2008).

A atuação dos antioxidantes no organismo é bem variada. Um dos mecanismos é o impedimento da formação das espécies reativas por inibição das reações em cadeia características deste processo. Antioxidantes podem também interceptar espécies reativas já formadas, impedindo que tais moléculas ataquem lipídeos, aminoácidos, proteínas e DNA, evitando, assim, lesões e perda de integridade celular (SALMON; RICHARDSON; PÉREZ, 2010). Em resposta a produção excessiva de espécies reativas pode ocorrer uma adaptação por parte do organismo aumentando a síntese de enzimas antioxidantes (DE OLIVEIRA et al., 2009).

Assim, o sistema de defesa antioxidante pode atuar antes que ocorra a lesão causada pela ação dos radicais livres, por meio da ação da glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E, ou então, reparar a lesão ocorrida, por meio da ação do ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSH-Rd), GSH-Px, entre outros. A maior parte dos agentes oxidantes está no meio intracelular, com exceção da vitamina E que é um antioxidante estrutural da membrana (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O sistema de defesa antioxidante é dividido em não-enzimático e enzimático. Entre os antioxidantes não-enzimáticos temos aqueles obtidos na dieta, entre os quais se destacam vitaminas (ácido ascórbico ou vitamina C, tocoferol ou vitamina E, betacaroteno ou vitamina A, etc.), minerais e compostos fenólicos e aqueles produzidos pela própria célula, como por exemplo, a glutatona ou GSH, o ácido alfa-lipoico, a coenzima Q, a ferritina, o ácido úrico, a bilirrubina. Entre os antioxidantes enzimáticos temos a grande família de enzimas conhecidas como citocromo P450 (CYPs) as quais convertem moléculas hidrofóbicas em substâncias mais solúveis para excreção, além da SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e GSH-Px (BERNARDINI et al., 2005; SHARMA et al., 2000).

Nos últimos anos, tem sido proposto que as ERO participam do mecanismo de ação dos antifúngicos azóis (DA SILVA et al., 2013; FERREIRA et al., 2013). Em um estudo com células de *Candida albicans* foi evidenciada a expressão de genes específicos de reposta a estresse oxidativo quando as células foram expostas a diferentes concentrações de Fluconazol por diferentes tempos de incubação (ARANA; NOMBELA; PLA, 2009). No entanto, este mecanismo antifúngico não está totalmente compreendido e as espécies reativas de oxigênio por azóis, especialmente o Fluconazol ainda precisa ser melhor investigado.

1.5 LINHAGENS CELULARES COMO MODELO DE ESTUDO E A LINHAGEM VERO

O cultivo de células se iniciou no começo do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912, com o objetivo de se estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado, vindo a tornar-se uma importante ferramenta de pesquisa nos laboratórios do mundo inteiro (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

O conhecimento da biologia da célula em cultura faz-se necessário em vários aspectos de sua fisiologia. No entanto, uma célula em cultura funciona de forma distinta de uma no organismo, pois no organismo, a célula faz parte de uma estrutura que mantém contato direto, ou indireto, com diversos tipos de outras células que interferem na manutenção de um microambiente não reproduzido em cultura. Por este motivo, o uso da cultura de células, como ferramenta de estudo das funções celulares ou do comportamento celular em condições que simulem uma determinada situação, tem sido questionado (MARTINS; BOAVENTURA; LIMA, 2005). Por outro lado, é muito válido dispor de um sistema livre de interferências externas, que permita a investigação de uma de forma precisa. Para isso, o cultivo de células é bastante indicado.

Estudos *in vitro* com cultivo de células têm tido importante papel na Medicina, uma vez que tem permitido ampliar o conhecimento da biologia celular e o desenvolvimento de tratamentos de doenças degenerativas, não limitando-se apenas ao estudo do comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro* (MOLINARO, 2009). De fato, o controle do ambiente, a homogeneidade da amostra e o baixo custo, quando comparado ao uso de animais experimentais, são as principais vantagens dessa técnica. Atualmente, a cultura de células tem sido o principal modelo alternativo para a substituição dos animais em experimentos de pesquisa (MOLINARO, 2009; LEITÃO, 2013).

Células utilizadas para estudos de genotoxicidade podem ser obtidas através de culturas primárias que são adquiridas a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação, enzimática ou química. As células que conseguirem sobreviver ao processo de desagregação e aderirem à garrafa formarão a primeira monocamada de células. Estas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas células primárias (LEITÃO, 2013).

À medida que a cultura é repicada, as células com uma maior capacidade de proliferação irão predominar na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram bem ao cultivo ou que, devido a traumas do processo de desagregação, não possuem uma taxa normal de proliferação. Essas células ainda não perderam as características do tecido de origem, mas possuem alta proliferação. Esse tipo de célula é chamado linhagem celular contínua, e é muito utilizado em pesquisa, pois pode ser mantido em cultura por um grande período de tempo (quando comparado as células primárias) e ainda guarda grande parte das características do tecido original (MARTINS; BOAVENTURA; LIMA, 2005).

Células contínuas adquirem a capacidade de proliferar indefinidamente, quer através de mutações gênicas ou modificações artificiais. A imortalização ocorre quando os mecanismos de morte celular são desativados, permitindo a manutenção destas células indefinidamente (MAQSOOD et al., 2013). Assim, no momento em que as características genéticas das células são modificadas, elas deixam de ser semelhantes morfológica e geneticamente ao tecido original e são então chamadas células transformadas. Tais células podem ser transformadas em cultura utilizando-se substâncias químicas, vírus ou agentes físicos como a luz ultravioleta (SHEETS, 2000). As células transformadas também podem ser obtidas diretamente de tecidos já mutados, como é o caso de tecidos tumorais. O exemplo mais famoso desse tipo de célula são as células HeLa oriundas de um tumor de cérvix uterina humana. Essas células são muito utilizadas em estudos de citotoxicidade, controle de qualidade, entre outros (BRETAS, 2011).

As linhagens de células transformadas apresentam a vantagem de disponibilidade quase ilimitada, por crescerem de forma contínua, suportando mais de 100 passagens *in vitro*. Elas são fáceis de manusear e amplamente publicadas, pois consistem em um tipo celular que pode ser utilizado na rotina laboratorial sem risco eminente de senescência (VIRGINIO; TEIXEIRA, 2004), em contraste com as células primárias que tem vida limitada. No entanto, elas são menos preferidas como uma opção biologicamente relevante, uma vez que perdem as verdadeiras características do tecido original a partir do qual foram isoladas (KAUR; DUFOUR, 2012).

Em 1962, Nakamura e colaboradores, estabeleceram a linhagem VERO, a partir de células epiteliais de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (BRETAS, 2011). Tal linhagem tornou-se uma das linhagens contínuas de mamífero comumente utilizada em pesquisas, sendo recomendada como modelo de pesquisa pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a produção de imunobiológicos de uso humano (YOKOMIZO, 2001) como, por exemplo, vacinas virais anti-rábicas e, na década de 80, para sarampo e poliomielite, além da produção comercial de novos anticorpos monoclonais. Pelo fato de apresentarem um rápido crescimento são úteis para produzir grande quantidade de vírus para caracterização e desenvolvimento de tais vacinas (TIWARI et al., 2006).

As células VERO são também usadas na avaliação da citotoxicidade de biomateriais, detecção de toxinas, teste de eficácia, teste de meios e micoplasma (UNCHERN, 1999; TAKATA et al., 1994; MORAIS; AUGUSTO; CASTILHO, 2008). É também recomendada para avaliar toxicidade de substâncias químicas *in vitro* (FERNÁNDEZ FREIRE et al., 2005) e medicamentos (PÉREZ et al., 2008), além de serem de grande uso em estudos microbiológicos (YU et al., 2000; DROSTEN et al., 2003) e em alguns estudos de toxicologia de metais (ROMERO et al., 2004a, 2004b) devido, principalmente, ao baixo custo (SWANSON et al., 1988).

Outros autores já demonstraram a utilização dessas células para avaliar nefrotoxicidade (HASSEN et al., 2007). Seu uso em estudos de nefrotoxicologia se justifica pelo fato de que muitos fatores, tais como: o alto fluxo de sangue, excreção predominante de muitas drogas e a concentração gradual de compostos filtrados e secretados tornam os rins particularmente sensíveis e vulneráveis a danos tóxicos (FANOS; CUZZOLIN, 2008).

Pelo exposto, visamos com o presente estudo ampliar o conhecimento existente a respeito dos efeitos celulares do Fluconazol, avaliando *in vitro* sua genotoxicidade aliada a outros parâmetros, tais como citotoxicidade e indução do estresse oxidativo, em linhagem de rim de macaco verde africano (Vero). Assim, pretende-se gerar informações que contribuam para a diminuição do risco do aparecimento de doenças secundárias, como o câncer, em

pacientes que fazem tratamento das diversas afecções que tem como medida terapêutica a utilização do Fluconazol.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos induzidos pelo antifúngico Fluconazol *in vitro* em linhagem de rins de macaco verde africano (Vero).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a viabilidade celular da linhagem de rins de macaco verde africano (Vero) após o tratamento com diferentes concentrações do Fluconazol através do teste do MTT;
- b) Investigar a frequência de micronúcleos induzida na linhagem de rins de macaco verde africano (Vero) em resposta aos diversos tratamentos com Fluconazol;
- c) Avaliar o índice de dano ao DNA demonstrado pela linhagem de rins de macaco verde africano (Vero) após o tratamento com diferentes concentrações de Fluconazol utilizando o teste do cometa;
- d) Avaliar os efeitos do Fluconazol na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na linhagem de rins de macaco verde africano (Vero);
- e) Investigar a indução de apoptose e necrose em linhagem de rim de macaco verde africano (Vero) após o tratamento com diferentes concentrações do Fluconazol por marcação fluorescente diferencial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FLUCONAZOL

Para a realização do presente estudo foi utilizado o antifúngico Fluconazol (2-(2,4-difluorophenyl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-propanol) (CAS 86386-73-4, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). O Fluconazol foi diluído em DMSO (CAS 67-68-5, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para, em seguida, obter-se as concentrações finais desejadas.

3.2 LINHAGEM CELULAR

A linhagem celular Vero – rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro – BCRJ. Para a realização dos experimentos foram utilizadas ampolas contendo aproximadamente um milhão de células, cada uma, mantidas em solução de congelamento, constituída por 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 47,5% de meio de cultura DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) na proporção de 1:1 e 47,5% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, Grand Island, NY, USA), 0.1 mg/ mL de estreptomicina e 99 U/ mL de penicilina. As ampolas foram armazenadas em botijões de nitrogênio líquido por período indeterminado, retiradas somente no momento do uso e descongeladas em banho-maria. Após o descongelamento, as células foram imediatamente transferidas para garrafas de 25cm² para cultivo celular, suplementando-se com 5 ml de meio de cultura DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) contendo 15% de soro bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY, USA). Posteriormente, as células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C por 24 horas. Após este período, o meio contendo DMSO foi substituído por meio completo (DMEM + SBF) para melhor crescimento da monocamada celular. Todos os procedimentos envolvendo cultura de células foram realizados em cabine de fluxo laminar de classe II A2.

3.3 CULTIVO DAS LINHAGENS

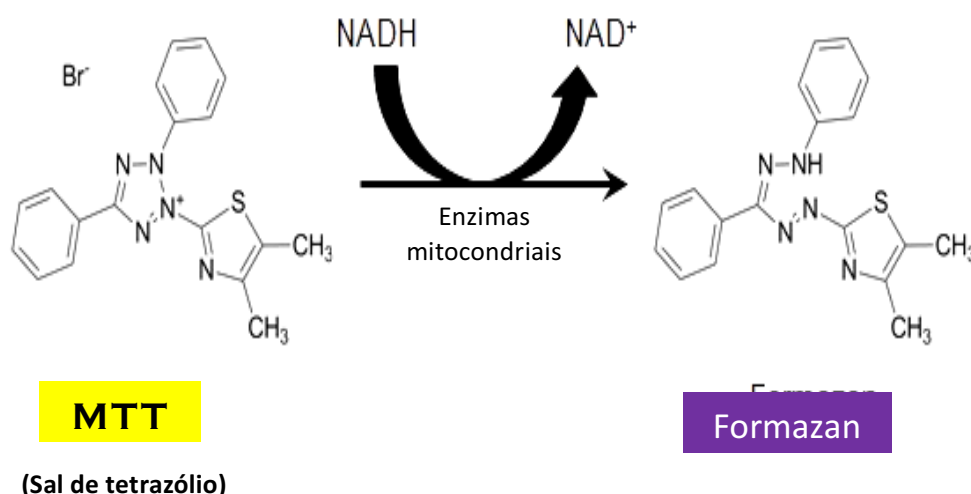
As garrafas contendo a cultura celular foram mantidas em estufa de CO₂ 5% com temperatura constante de 37°C até que as células cheguem à confluência, isto é, a monocamada celular esteja completamente fechada, o que pode ocorrer por volta de 72 horas após o descongelamento. A confluência celular foi acompanhada observando-se o crescimento das células com auxílio de microscópio invertido. Para o subcultivo, o meio utilizado pelas células foi desprezado em recipientes apropriados e a monocamada foi lavada duplamente pela solução salina balanceada de Hanks (0,4g de KCl, 0,06g de KH₂PO₄, 0,04g de Na₂HPO₄, 0,35g de NaHCO₃, 1g de glicose, 8g de NaCl, H₂O q.s.p 1000 ml) por aproximadamente 2 minutos, sendo utilizado um volume de 3ml em cada lavagem. A solução obtida após a lavagem das células foi retirada com auxílio de pipetas volumétricas. Após isto, foi necessária a utilização de tripsina (0,125g de tripsina, 0,02g EDTA diluídos em 100ml de solução de Hanks) na quantidade de 3ml para cada garrafa de 25cm² por 1 ou 2 minutos ou até que as células se desprendam da parede da garrafa de cultivo, sendo possível verificar a soltura em microscópio invertido. Posteriormente, a tripsina foi inativada pela adição de 15ml de meio de cultura DMEM acrescido com 15% de SBF, 0.1 mg/ mL de estreptomicina e 99 U/ mL de penicilina e a suspensão celular foi agitada e dividida igualmente para duas garrafas de cultivo de 25 cm² ou uma de 75 cm², até que haja novamente a confluência das células, e então o procedimento foi repetido, até obter-se uma quantidade de células suficientes para os experimentos.

3.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

3.4.1 Princípio da Técnica

Para a avaliação deste parâmetro foi utilizado o teste do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Amresco). O princípio do método é a redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazólio MTT, por enzimas mitocondriais resultando em um produto azul/roxo chamado formazan que pode ser quantificado por espectrofotometria. Desta forma esta reação ocorre somente em células vivas e que estejam com suas mitocôndrias ativas, configurando-se assim um ensaio versátil e quantitativo para avaliação da viabilidade celular (Figura 2) (MOSMANN, 1983).

Figura 2 – Formação de cristais de formazan a partir do sal de tetrazólio MTT.



Fonte: RISS et al. (2013) adaptado.

3.4.2 Procedimento Experimental

As células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços (Corning) a uma concentração de 8×10^3 células/poço em um volume final de 200 μ L de meio para todas as células, sendo posteriormente incubadas durante 24 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após o período inicial de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de Fluconazol por 24 horas. Após o tratamento, 100 μ L de MTT (5.000 μ g/mL) foram acrescentados às células por 3 horas. Em seguida, o MTT foi retirado e foram acrescentados 100 μ L de DMSO (Sigma®) por uma hora, com o objetivo de dissolver o formazan obtida durante o processo. Em seguida, o DMSO foi lido em espectrofotômetro ($\lambda=562$ nm) (VALADARES; CASTRO; CARLOS, 2007). A sobrevivência celular foi calculada com a porcentagem de absorbância em relação à absorbância do controle. As concentrações de Fluconazol utilizadas no experimento foram de 81,6; 163,2; 326,5; 653; 1.306 e 2.612,1 μ M. Estas concentrações foram escolhidas com base em experiências anteriores realizadas *in vitro* (YÜZBAŞIOĞLU et al., 2008). No entanto, estudos clínicos mostraram que a concentração máxima de Fluconazol observada em voluntários foi dez vezes menor do que a menor concentração (81,6 μ M) utilizada no presente estudo (JOVANOVIĆ et al., 2005).

3.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

3.5.1 Princípio da Técnica

Micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo das células filhas durante a divisão celular (FENECH, 2007). A presença de micronúcleos nas células em proliferação é um sensível marcador de dano cromossômico espontâneo e induzido (MATEUCA et al., 2006).

De fato, como um micronúcleo pode ser formado tanto de fragmentos de cromossomos acêntricos como pelo atraso de cromossomos inteiros durante a divisão celular, a análise de micronúcleos permite a avaliação de eventos clastogênicos (induzidos por quebra na cadeia de DNA) e aneugênicos (induzidos por má segregação cromossômica) ao mesmo tempo (SCARPATO et al., 2011).

O Teste de Micronúcleo é amplamente empregado na avaliação da exposição humana a agentes potencialmente genotóxicos (MEIRELES et al., 2013) e no biomonitoramento de grupos sob risco de desenvolvimento do câncer (CHANG; LI; LI, 2011). O Teste de Micronúcleo em linfócitos humanos é um dos métodos mais comumente utilizados, particularmente quando realizado com o bloqueio da citocinese (Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese) (FENECH et al., 2007).

3.5.2 Procedimento Experimental

Para o teste do micronúcleo foram semeadas 1×10^6 células/mL. Após 24h em cultura, as células foram tratadas com diferentes concentrações de Fluconazol (81,6; 326,5 e $1.306 \mu\text{M}$). Vale ressaltar que além do tratamento com a droga foram feitos um controle negativo somente com meio de cultura e um controle positivo, N-methyl-N-nitrosourea (NMU) (CAS 684-93-5, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), um agente alquilante carcinogênico na concentração final de $1.212,6 \mu\text{M}$. A concentração de NMU foi definida de acordo com ensaios anteriores de MTT realizados em nosso laboratório (dados não mostrados). Passadas 24h do tratamento (48h de incubação após o início da cultura), foi adicionado à cultura $3 \mu\text{g/mL}$ de citocalasina-B (CtB) (Sigma Chemical Co.), substância que bloqueia a citocinese, por inibir a polimerização dos filamentos de actina, responsável pela formação do anel de microfilamentos que induz a contração do citoplasma e a formação de duas células filhas; sendo de crucial importância para a obtenção de células binucleadas. Após 24h com CtB (72h de incubação após o início da cultura), as células foram transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas

(5min/800rpm). O sobrenadante foi descartado deixando 0,5mL para leve homogeneização. Em seguida, foi adicionado vagarosamente pela parede do tubo 5mL de solução hipotônica gelada (KCl 0,075 M) e o material novamente homogeneizado e levado para centrifugação (5min/800rpm). Após esse processo, o sobrenadante foi descartado deixando 0,5 ml para homogeneização. Logo em seguida, foi adicionado 5mL de fixador (metanol/ácido acético 5:1) recém preparado e 3 gotas de formaldeído, o qual irá auxiliar na preservação do citoplasma; logo então o conteúdo foi novamente homogeneizado com cuidado. Em seguida, foi centrifugado (5min/800rpm) e o sobrenadante descartado deixando 0,5mL para a ressuspensão. Após esta etapa foi adicionado em leve agitação 5mL de fixador (metanol/ácido acético 3:1) recém preparado. O conteúdo foi novamente homogeneizado e centrifugado (5min/800rpm). Por fim, após mais uma lavagem com fixador 3:1, o sobrenadante foi descartado deixando aproximadamente 400 µL de suspensão no tubo para a preparação das lâminas. Para cada lâmina foram utilizadas 3 a 4 gotas dependendo da quantidade de material. As lâminas foram secas a temperatura ambiente e coradas com Giemsa (Sigma Chemical Co.) 5 % em por 5 min. Além do micronúcleo convencional foi também avaliado o Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese (IPBC) em microscópio óptico de luz (BIOVAL L2000A) com aumento de 1000x.

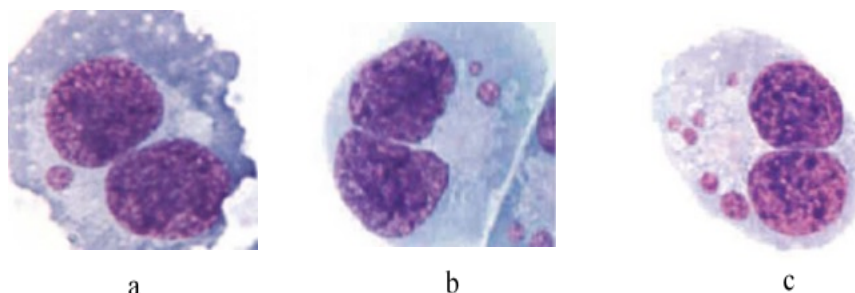
3.5.3 Critérios para a Seleção das Células (FENECH et al., 2003).

- Mil (1000) células binucleadas com membrana intacta;
- Núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático;
- Células claramente distinguíveis das células adjacentes.

3.5.4 Análise dos Micronúcleos (MN)

A análise foi realizada em 1000 células binucleadas para cada um dos diferentes grupos avaliados, com os micronúcleos obedecendo aos seguintes critérios: apresentar morfologia idêntica a dos núcleos principais; possuir diâmetro entre 1/16 até no máximo 1/3 dos núcleos principais; apresentar mesma coloração dos núcleos principais, mas ocasionalmente com maior intensidade; não apresentar refringências; não estar ligado ou conectado a um dos núcleos principais; e por fim, não se sobrepor aos núcleos principais (Figura 3) (FENECH et al., 2003).

Figura 3 - Fotomicrografias ilustrando células binucleadas micronucleadas (coradas com Giemsa) com um (a), dois (b) e seis (c) micronúcleos. Todas as células obedecem aos critérios de análise para micronúcleo.



Fonte: FENECH et al., 2003.

3.5.5 Análise do Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC)

O IPBC foi analisado em 500 células a partir da seguinte fórmula: $IDN = [M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4)] / N$, em que M1 à M4 = número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente e N = número total de células (FENECH et al., 2003).

3.6 ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA)

3.6.1 Princípio da Técnica

Esta técnica foi desenvolvida por Singh et al. (1988) e, posteriormente, modificada por Anderson (1996). A técnica corresponde a um ensaio de grande sensibilidade para a detecção de vários tipos de danos no DNA (quebra de fitas duplas ou simples, danos oxidativos e ligações cruzadas) induzidos por compostos genotóxicos e mutagênicos.

Partindo-se do pressuposto de que o DNA encontra-se fortemente compactado dentro do núcleo, formando alças de 5-200 Kpb, as quais se encontram aderidas a uma rede proteica ou matriz nuclear (COOK; BRAZELL, 1976; COOK et al., 1978; ERIKSSON; NYGREN; AHNSTRÖM, 2002; GROMOVA; RAZIN; IAROVAIA, 1996), se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, sendo maior e mais pesado que o restante dos componentes ocupará um espaço no gel, o qual era anteriormente preenchido pela célula e foi retido em uma estrutura residual semelhante a um núcleo denominada

nucleóide (COOK; BRAZELL, 1976). Desta forma, o nucleóide é por definição, uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual do tamanho do núcleo da célula. Portanto, caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofrerá mudanças, uma vez que as alças de DNA se desenovelam, tornando-se mais frouxas e formando um halo (COOK; BRAZELL, 1976; COOK et al., 1978; VOGELSTEIN; PARDOLL; COFFEY, 1980).

3.6.2 Preparo das Lâminas

As lâminas foram previamente cobertas em solução de agarose com ponto de fusão normal (1,5%). Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão na segunda camada de agarose com baixo ponto de fusão (0,8%), na qual a amostra foi diluída. As células foram previamente cultivadas conforme descrito para o teste do micronúcleo. Em seguida, diferentes concentrações de Fluconazol (81.6, 326.5 e 1.306 μ M) foram adicionadas as culturas por 3 horas. O controle positivo foi o MNU (1.212 μ M). Após o tratamento, foram coletados 450 μ L de amostra de cada grupo (controle positivo, controle negativo e as concentrações de cada droga) e em seguida feita uma centrifugação (5min/1000 rpm) em microcentrífuga (Eppendorff). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado deixando 30 μ L para a ressuspensão. Deste conteúdo, 15 μ L foram acrescentados em 300 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,8%), sendo em seguida homogeneizado. Subsequentemente, 100 μ L deste conteúdo foram aplicados rapidamente sobre cada lâmina contendo agarose e em seguida, cada lâmina foi coberta com uma lamínula (24 x 60 mm). As lâminas foram mantidas a 4°C por 5 min até a solidificação da agarose. Após este período, as lamínulas foram removidas cuidadosamente, e as lâminas mergulhadas em solução de lise (2,5M NaCl; 100mM EDTA; 10mM Tris, 1% Triton-X e 10% DMSO; pH=10) e mantidas a 4°C e protegida da luz.

3.6.3 Eletroforese

Após a remoção das lâminas da solução de lise, as mesmas foram dispostas em posição horizontal na cuba de eletroforese. Em seguida, a cuba foi preenchida com a solução de eletroforese (1mM EDTA e 300mM NaOH; pH $\geq$ 13) a 4°C recém-preparada, a um nível superior (0,25 cm, em média) às lâminas. As lâminas foram mantidas em repouso por 20 min antes da eletroforese a fim de permitir o desenovelamento do DNA, o afrouxamento de suas

ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. Após este processo, a eletroforese foi realizada a uma tensão (d.d.p: diferença de potencial) de 34 V em corrente de 300mA por um período de 25 min. Vale ressaltar que todos esses processos foram realizados em baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas rapidamente em H₂O destilada gelada (4°C) para a remoção dos resquícios da solução de eletroforese e, em seguida, transferidas para um novo mergulho em H₂O destilada gelada por 5 min para a neutralização.

3.6.4 Coloração

As lâminas foram fixadas com etanol a 100% por 3 min e posteriormente coradas com 50µL de solução de Brometo de Etídio (20µg/mL). Em seguida, foram cobertas com lamínula (24 X 60 mm) para a realização das análises e preparadas em duplicatas.

3.6.5 Análise das Lâminas

As lâminas foram preparadas em duplicatas e analisadas 100 células por amostra (50 células por lâmina) em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) com objetiva de 40x.

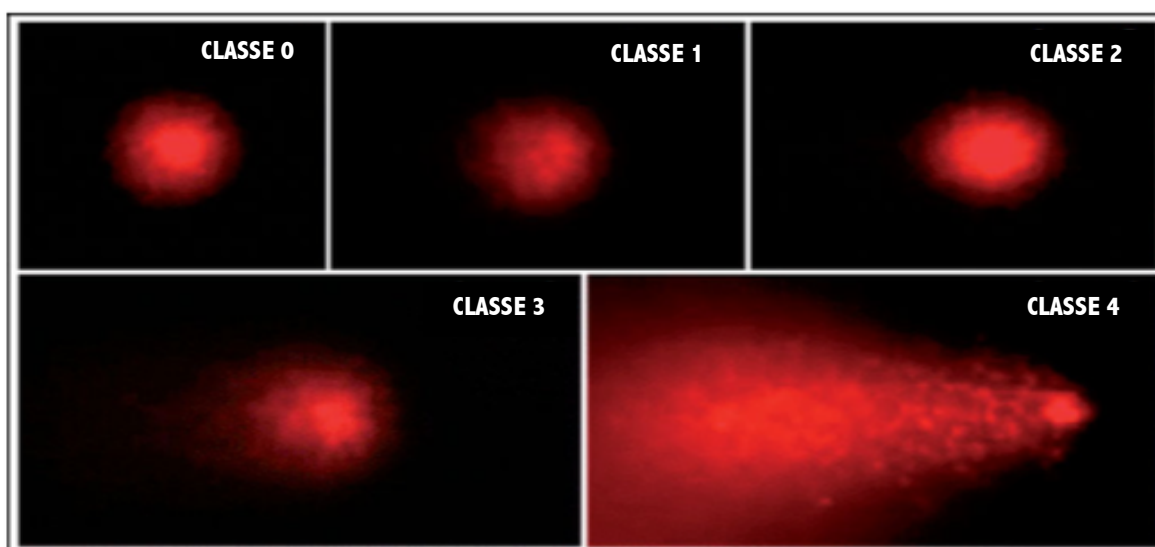
O Índice de Dano ao DNA (ID) foi calculado multiplicando-se o número de células em cada nível pelo padrão de escores (que vai de 0 – 4) (Figura 4) de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa, que representa o nível de fragmentação de DNA (tabela 1), indicando o grau de lesão sofrido pela célula.

O Índice de Dano ao DNA (ID) foi calculado multiplicando-se o número de células em cada nível pelo escores a qual ele se enquadra, somando esses valores, e por fim, o resultado obtido deve ser dividido por 100, que corresponde ao total de células analisadas.

Tabela 1 – Classificação em cinco categorias de danos no DNA de acordo com a intensidade relativa da cauda do cometa.

0 = sem danos (<5%)
1 = baixo nível de danos (5-20%)
2 = médio nível de danos (20-40%)
3 = alto nível de danos (40-95%)
4 = dano total (95%)

Figura 4 – Padrão de escores (classe de 0 – 4) utilizados para determinação do índice de dano (ID) no teste do cometa.



Fonte: CARDOSO et al. 2018.

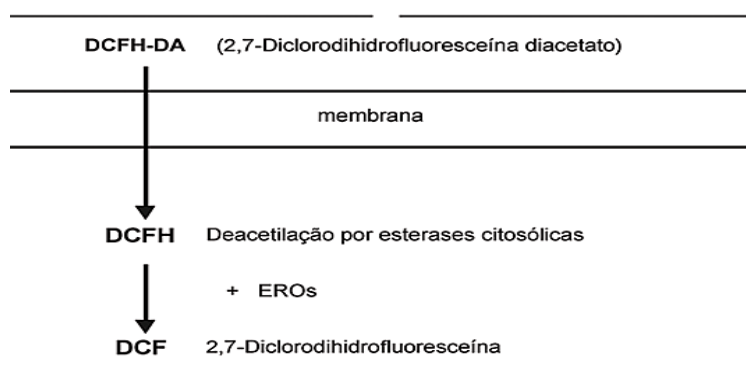
3.7 ENSAIO DO DICLORODIHIIDROFLUORESCEÍNA-DIACETATO (DCFH-DA)

3.7.1 Princípio da técnica

É conhecido que o composto 2',7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) pode ser oxidado intracelularmente por vários agentes oxidantes, tais como, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion radical superóxido, hidroperóxidos lipídicos, entre outros; o que o torna um importante marcador para a determinação de espécies reativas de oxigênio (BILSKI;

BELANGER; CHIGNELL, 2002; ROTA; FANN; MASON, 1999). O reagente DCFH-DA (Figura 5) difunde-se passivamente pela membrana plasmática e no interior da célula é hidrolisado por uma esterase, reação que provoca a liberação de uma substância denominada 2',7' diclorodihidrofluoresceína (DCFH), a qual tem afinidade por espécies reativas de oxigênio. Desta forma, a diclorofluoresceína liberada reage com as ERO liberando uma grande quantidade de substância fluorescente conhecida como, 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF), a qual é impermeável à membrana plasmática ficando aprisionada no meio intracelular; e assim podendo ser mensurada, e ter os níveis de ERO estimados de acordo com a intensidade de fluorescência produzida (LIU et al., 2001).

Figura 5 – Princípio do ensaio do DCFH-DA para determinação de ERO no meio intracelular.



Fonte: SILVEIRA (2004).

3.7.2 Procedimento Experimental

A produção de ERO intracelular foi determinada pelo método fluorométrico por meio da oxidação intracelular do composto DCFH-DA (Sigma Chemical Co. / St. Louis, MO, USA) como descrito anteriormente por Bai e Cederbaum, 2003. Para o ensaio do DCFH -DA foram semeadas $0,5 \times 10^6$ células/poço em placas de 6 poços em um volume final de 2mL de meio para todas as células. Após 24h em cultura, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de Fluconazol (81,6; 326,5 e $1.306\mu\text{M}$) por 1 h a 37°C . Vale ressaltar que além do tratamento com as drogas, foram feitos um controle negativo, somente com meio de cultura

e um controle positivo com 2mM de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) de acordo com Engelmann et al. (2005). Passado 1 h do tratamento, as células foram incubadas com 10μM de DCFH-DA (diluído em DMSO) por 30 min a 37°C na ausência de luz. Após este período, as células foram centrifugadas (1000rpm/5min) e o sobrenadante descartado. Em seguida as células foram lavadas uma vez em PBS 1X para a remoção dos resquícios de DCFH-DA e novamente centrifugadas (1000rpm/5min). Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de PBS 1X. Na sequência, amostras foram coletadas para análise em espectrofotômetro de fluorescência (RF-5301PC, Shimadzu), com absorvância de 485 nm para excitação e 528 nm para emissão.

3.8 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE UTILIZANDO COLORAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL COM HOECHST 33342 / IODETO DE PROPÍDEO (PI) / DIACETATO DE FLUORESCÉINA (DAF)

3.8.1 Princípio da Técnica

O corante bisbenzidina Hoechst 33342 é permeável às membranas celulares e se une às ligações adenina-timina emitindo fluorescência azul, sendo utilizado para avaliação de ciclo celular, apoptose e quantificação de células viáveis. Este corante é frequentemente incubado na presença de substâncias indutoras de apoptose por minutos até horas (KIECHLER & ZHANG, 2002). O Hoechst 33342 é rapidamente absorvido pelas células durante as fases iniciais da apoptose, período em que a membrana citoplasmática ainda encontra-se íntegra e impermeável a outro corante fluorescente denominado iodeto de propídio (IP). Fases tardias da apoptose apresentam corpos apoptóticos e são acompanhadas pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, o que permite a entrada de IP nas células, marcando-as em vermelho. Desta forma, a combinação do Hoechst 33342 com o IP tem sido intensamente utilizada para a diferenciação dos estágios de apoptose e necrose. Pode-se também adicionar o corante diacetato de fluoresceína (DAF) que marca em verde células com membrana celular intacta. Assim, as células são avaliadas de acordo com a coloração e morfologia, sendo que as marcadas com citoplasma verde e núcleo azul intacto são consideradas viáveis; as com núcleo azul condensado ou fragmentado ou núcleo vermelho condensado ou fragmentado são classificadas como apoptóticas e, por fim, as com núcleo intacto vermelho são identificadas como necróticas (HASHIMOTO et al., 2003).

3.8.2 Procedimento Experimental

Para detecção de apoptose foram cultivadas $0,5 \times 10^6$ células/poço em placa de 6 poços que foram posteriormente incubadas por 24 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Passada as 24h de cultivo, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de Fluconazol (81,6; 326,4 e 1.305,6µM) por 24 e 48 h. NMU (1.212µM) foi usado como controle positivo. Posteriormente, finalizado cada tempo de tratamento, foi feita a colheita do material. O meio de cultura foi transferido de cada poço, para tubos de 15mL para centrifuga, com a finalidade de coletar também as células que se desprenderam da superfície do fundo dos poços, uma vez que células apoptóticas se desprendem com facilidade. Em seguida, os poços foram lavados com 2ml de Hanks 1x, sendo estes adicionados aos tubos de centrifuga. Em seguida, 1mL de tripsina foi adicionada as células aderidas com intuito de desprende-las e na sequência inativadas. As células foram transferidas para o tubo de centrifuga de 15mL, centrifugadas por 5 min à 1000 rpm e o sobrenadante descartado, deixando aproximadamente 300µL de meio para a ressuspensão das células. Posteriormente, um volume de 100µL da suspensão celular foi transferido para tubos de microcentrifuga e, em seguida, foram adicionados a estes tubos 7µL da solução com os três corantes (foram preparados 100 µL da solução corante: 25 µL de Iodeto de propídio [PI] 1mg/ml diluído em água destilada + 50 µL de Fluoresceína diacetato [DAF] 1,5 mg/mL diluído em DMSO + 10 µL de Hoeschst 33342 [HO] 1mg/mL diluído em água destilada + 15 µL de PBS [pH= 8,0]). Após o acréscimo do corante, as células foram levadas ao banho-maria à 37° C por 5 min. Em seguida, as lâminas foram confeccionadas acrescentando-se 100 µL de amostra em cada uma, as quais foram cobertas posteriormente com lamínulas. Após este processo, as lâminas foram levadas imediatamente para quantificação em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41 com filtro triplo (DAPI, FITC e TRITC). Foram avaliadas 300 células/grupo de tratamento. As células foram classificadas em viáveis, apoptóticas e necróticas.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

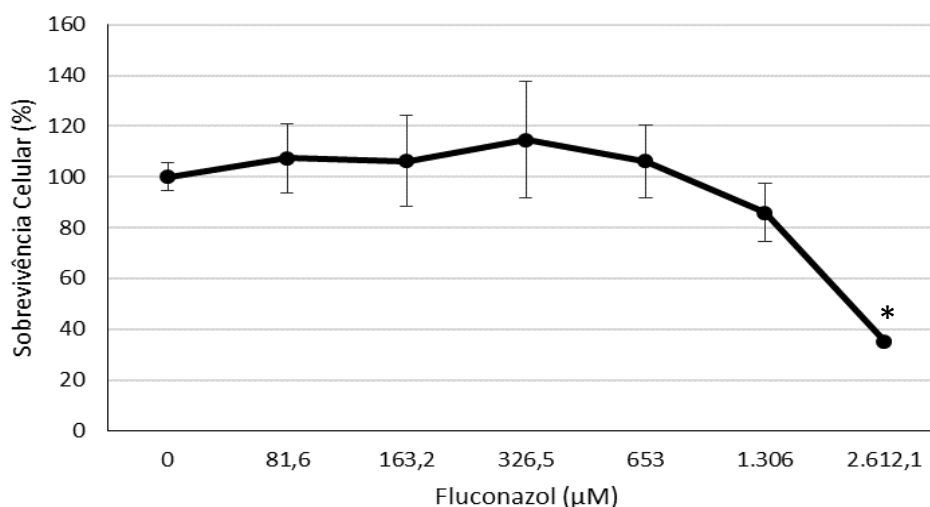
Para os dados que se enquadrarem nas premissas de normalidade, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Porém, para os dados que não se enquadrarem na premissa de normalidade foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. O nível de significância considerado foi de 5%. O programa utilizado para realizar as análises foi o BIOESTAT versão 5.0 (AYRES et al., 2007).

4 RESULTADOS

4.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

A linhagem VERO foi submetida ao tratamento por 24 horas, a diferentes concentrações de Fluconazol. Como pode ser observado (figura 6) houve diminuição nas porcentagens de sobrevivência celular a partir da concentração 1.305,6 μ M, sendo esta diminuição estatisticamente significativa na concentração de 2.611,2 μ M quando comparado com o controle (100%). Os valores de viabilidade celular foram de 107,34; 106,27; 114,68; 106,19; 85,93 e 35,25% para o Fluconazol nas concentrações de 81,6; 163,22; 326,4; 652,8; 1.305,6 e 2.611,2 μ M, respectivamente.

Figura 6 – Efeito do Fluconazol em células Vero analisado pelo ensaio do MTT. * P <0,05 (Kruskal-Wallis / pós-teste de Dunn) comparado ao controle. Os dados foram expressos com os valores médios obtidos a partir de três experimentos em duplicata.

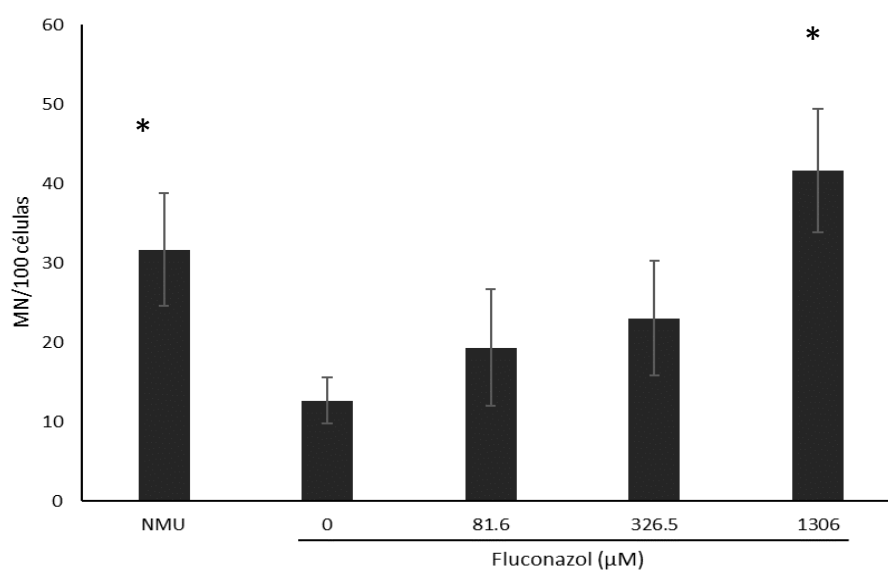


4.2 TESTE DO MICRONÚCLEO

As concentrações de Fluconazol (81,6; 326,4; 1.305,6 μ M) utilizadas para o teste do micronúcleo foram selecionadas a partir dos resultados do teste MTT. Para cada 1000 células binucleadas analisadas em concentrações de 81,6; 326,5 e 1306 μ M de Fluconazol, as frequências médias correspondentes de MN foram 19; 23 e 42, respectivamente. Assim, os nossos resultados demonstraram que houve um aumento na frequência de células com

micronúcleos a medida que aumentava a concentração de Fluconazol. No entanto, houve um efeito genotóxico significativo ($p < 0,05$) apenas na maior concentração testada ($1.306 \mu\text{M}$) em comparação com controle negativo (42MN/1000 células binucleadas e 13MN/células binucleadas, respectivamente). O controle negativo também diferiu significativamente ($p < 0,05$) do positivo (NMU) (32MN/células binucleadas) (Figura 7). As frequências das médias do IPBC não diferiram significativamente entre o controle negativo e os grupos tratados (Tabela 2). As concentrações utilizadas nos ensaios do MN, cometa, DCFH-DA e na avaliação de necrose e apoptose por coloração diferencial fluorescente foram definidas com base nos resultados de viabilidade celular em células Vero em nosso estudo. As concentrações escolhidas tiveram uma porcentagem de viabilidade maior que 50% em comparação com a do controle (100%).

Figura 7 – Frequência de micronúcleos observada em células Vero após exposição à diferentes concentrações de Fluconazol por 24h. * $P < 0,05$ comparado ao controle (ANOVA / pós-teste de Tukey). Os dados são expressos com os valores médios obtidos a partir de três experimentos.



* $p < 0,05$ (ANOVA/pós-teste Tukey) comparado ao controle negativo.

Tabela 2: Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese (IPBC) observado em células Vero após exposição de diferentes concentrações de Fluconazol.

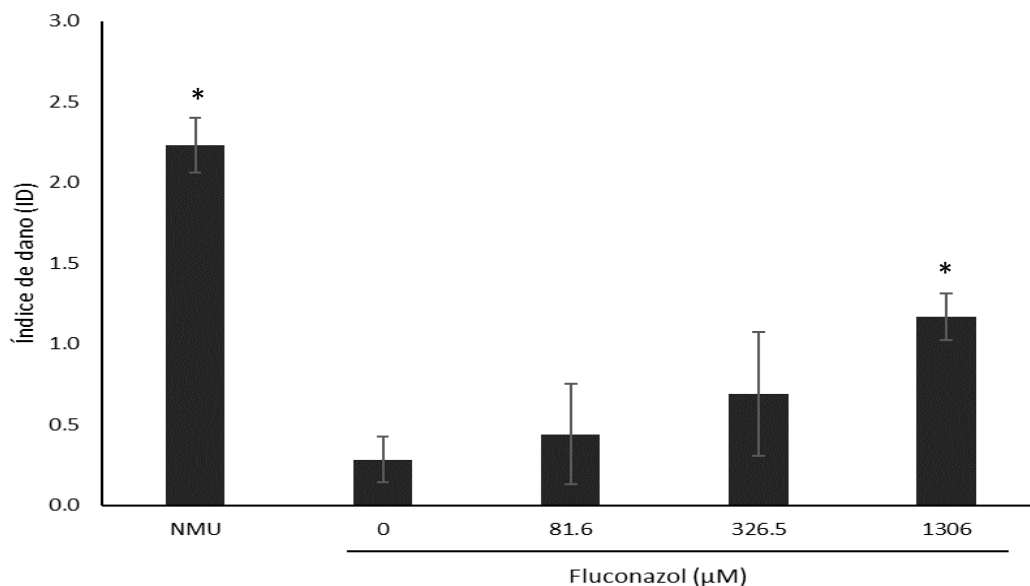
Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese (IPBC)					
Experimento	NMU(μM)	Controle	Fluconazol (μM)		
			81,6	326,5	1.306
1°	1.222	1.442	1.268	1.396	1.424
2°	1.330	1.364	1.268	1.396	1.424
3°	1.280	1.240	1.420	1.340	1.270
Média	1.277	1.349	1.319	1.377	1.373
Desvio-padrão	+/- 0.05	+/- 0.10	+/-0.09	+/- 0.03	+/- 0.09

*P>0.05 (ANOVA). Média de três experimentos.

4.3 TESTE DO COMETA

Os resultados do ensaio do cometa mostraram um aumento dose-dependente no Índice de Danos ao DNA (ID) da linhagem Vero após o tratamento Fluconazol. Para cada 100 células analisadas nas concentrações de 81,6; 326,5 e 1.306 μ M de Fluconazol, os ID correspondentes foram 0,44; 0,69 e 1,17, respectivamente. Foi observada uma diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre a concentração 1.306 μ M e o controle negativo (ID = 1,17 e ID = 0,28, respectivamente). Células tratadas com NMU apresentaram um ID = 2,23, que também foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$) quando comparado ao controle negativo. Além disso, o ID das células tratadas com NMU também foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$) quando comparado a todas as concentrações de Fluconazol (Figura 8).

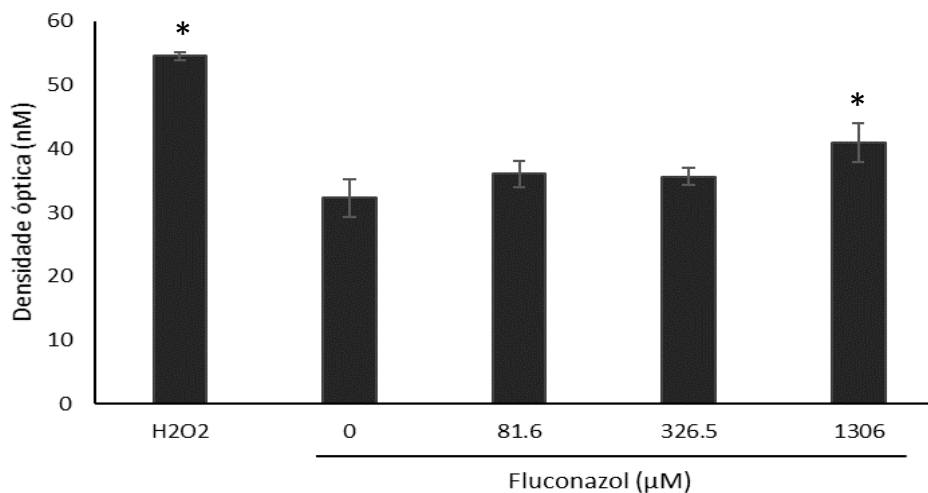
Figura 8 – Efeitos do Fluconazol em células Vero analisadas pelo ensaio do cometa. * $P < 0,05$ (ANOVA / pós-teste de Tukey) quando comparado com o controle. Os dados foram expressos como os valores médios obtidos a partir de três experimentos.



4.4 GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

A geração de ERO foi avaliada após o tratamento com Fluconazol pelo ensaio DCFH-DA. As médias de Densidade Óptica (DO) observadas foram de 36,1; 35,7 e 40,9 para as concentrações de Fluconazol de 81,6; 326,5 e 1.306µM, respectivamente. Significância estatística ($P < 0,05$) foi observada na concentração de 1.306µM em relação ao controle negativo (DO = 40,9 e DO = 32,3, respectivamente). Células tratadas com H_2O_2 tiveram uma DO de 54.5, o que também foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparado ao controle negativo. A DO das células tratadas com H_2O_2 também foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparada com todas as concentrações de Fluconazol (Figura 9).

Figura 9 – Geração de ERO induzida pelo Fluconazol em células Vero. * $P < 0,05$ (ANOVA / pós-teste de Tukey) quando comparado com o controle. Os dados são expressos como os valores médios obtidos a partir de três experimentos.



4.5 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE UTILIZANDO COLORAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL COM HOECHST 33342 / IODETO DE PROPÍDEO (PI) / DIACETATO DE FLUORESCÉINA (DAF)

Em nossas condições experimentais, o Fluconazol induziu necrose ($P < 0,05$) na linhagem celular VERO quando as células foram expostas a todas as concentrações (81,6; 326,5 e 1.306 μM) nos dois tempos de coleta testados (24 e 48h) em comparação com o controle negativo. Embora o Fluconazol não tenha sido capaz de induzir a apoptose em nossas condições experimentais, um aumento significativo desse tipo de morte celular foi observado quando as células foram expostas ao NMU, em comparação com o controle negativo, após 48h de tratamento (Figura 10).

Células necróticas corado em vermelho pelo Iodeto de Propídeo (IP) e células apoptóticas corados com Hoechst 33342 (HO) e célula viável corado com diacetato de fluoresceína (DAF) e núcleo azul corado com Hoeschst após o tratamento com Fluconazol (Figura 11).

Figura 10 – Porcentagem de morte celular induzida pelo Fluconazol em células Vero e analisada por coloração fluorescente diferencial. * $P < 0,05$ (ANOVA / pós-teste de Tukey e Kruskal-Wallis / pós-teste de Dunn) quando comparado com o controle. Os dados são expressos como os valores médios obtidos de quatro experimentos.

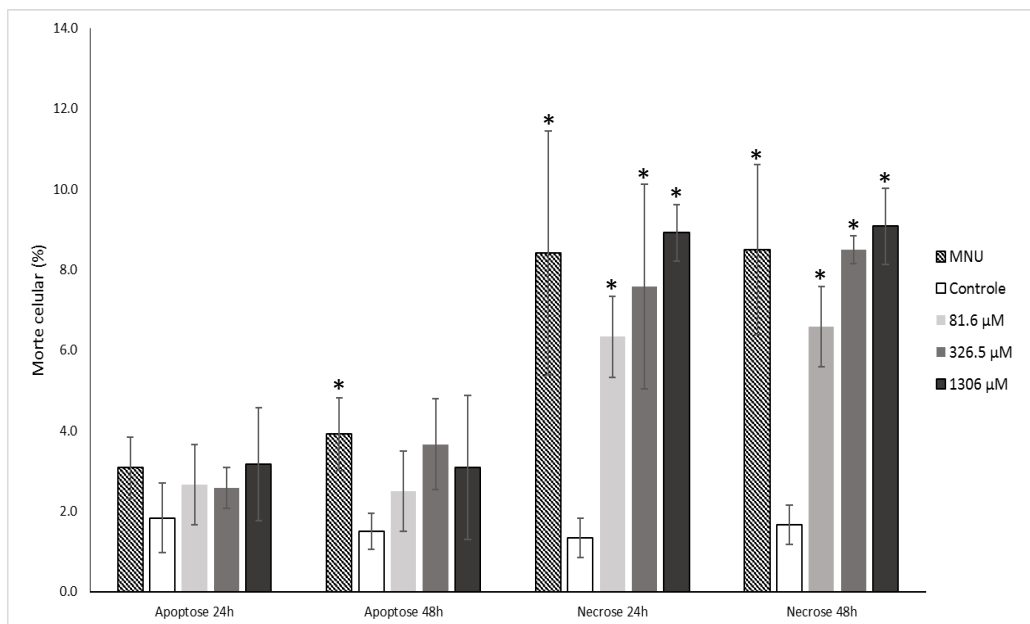
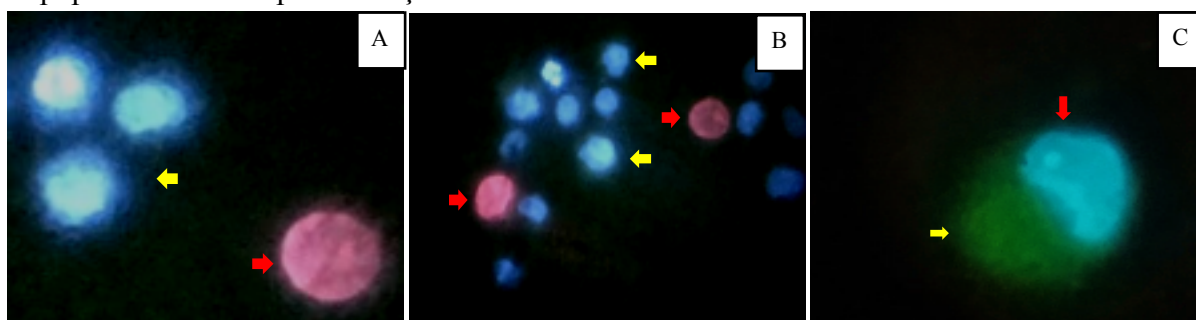


Figura 11 – Células Vero após o tratamento com Fluconazol e a realização do ensaio de apoptose e necrose por marcação fluorescente diferencial.



Fonte: acervo do autor. Legenda: em (A) Células necróticas com núcleo vermelho íntegro, esférico e em vesículas e citoplasma vermelho corado em vermelho pelo Iodeto de Propídeo (IP) (seta vermelha) e células apoptóticas com corpos apoptóticos corados com Hoechst 33342 (HO) que se liga ao DNA corando o núcleo em azul (seta amarela); (B) Células necróticas (seta vermelha) e células apoptóticas (seta amarela); (C) Célula normal com citoplasma verde corado com diacetato de fluoresceína (DAF) (seta amarela) e núcleo azul corado com Hoeschst (seta vermelha).

5 DISCUSSÃO

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 (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009; EL-ZEIN et al., 2005).

Nos seres vivos, o material genético é definido por uma ordem específica de nucleotídeos na molécula de DNA, no entanto, as bases desta molécula comumente estão expostas a variados agentes naturais e artificiais, que podem causar uma alteração na sua estrutura ou composição química, denominada de mutação (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLLA, 2003).

Dentre as principais fontes de exposição do homem a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos pode-se citar a dieta e o consumo de determinadas drogas que possuem potencial danoso, tais como: fumo, bebidas alcoólicas, drogas ilícitas e, como anteriormente citado, medicamentos (DÜSMAN et al., 2012).

O Fluconazol é uma importante droga usada na obstetrícia e ginecologia para o tratamento de candidíase vaginal. Além disso, é utilizado para tratar infecções em pessoas com sistema imunológico suprimido por quimioterapia contra o câncer, pacientes que receberam transplante de órgão ou pacientes com AIDS (GROPPELLI et al., 2007). Uma vez que esta droga é amplamente utilizada, são necessários mais estudos para avaliar seus efeitos citotóxicos e genotóxicos em células de mamíferos e estudos do biomonitoramento em pacientes que recebem a terapia com este medicamento. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos *in vitro* do Fluconazol em linhagem de rim de macaco verde africano (Vero) em diferentes concentrações do Fluconazol.

O teste do MTT é um dos indicadores colorimétricos de viabilidade celular mais utilizados, sendo capaz de avaliar a função celular mitocondrial de acordo com a redução enzimática do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis (MOSMANN, 1983). Em relação à este parâmetro, nossos resultados mostraram que o Fluconazol induziu uma diminuição significativa da viabilidade em células Vero, a partir das maiores concentrações testadas (Figura 6). No entanto, Rodriguez e Acosta (1997) verificaram que o Fluconazol não foi capaz de reduzir a viabilidade celular em um sistema de cultura primário de hepatócitos de rato através do teste do MTT, embora os autores tenham demonstrado que o cetonaazol, outro agente antifúngico azólico, tenha sido capaz de diminuir

a viabilidade celular dentro um intervalo de concentração de 25-200 μ M. Em seu estudo, hepatócitos de ratos tratados de forma curta (0,5-6 horas) foram expostos a concentrações mais baixas de Fluconazol (100-1000 μ M), enquanto, em nossos experimentos, concentrações de Fluconazol de 81,6-2.612,1 μ M foram administradas por 24 horas. De Logu et al. (2005) também testaram os efeitos do Fluconazol após um tratamento de 72 horas em células Vero usando MTT; surpreendentemente, eles não observaram uma diminuição na viabilidade celular, mesmo em concentrações tão altas quanto 1.000 mg/mL (3265.08 μ M). Apesar destes resultados, outros estudos demonstraram que o Fluconazol apresentou um claro efeito na viabilidade celular, da mesma forma que observamos em nossos experimentos, embora esse efeito tenha sido menos significativo quando comparado a outros azóis. Por exemplo, Somchit et al. (2002) mostraram que o itraconazol foi mais citotóxico em hepatócitos de ratos *in vitro* através do teste de determinação da atividade do lactato desidrogenase (LDH) quando comparado ao Fluconazol. Também foi observado que o Fluconazol foi menos citotóxico em comparação com o itraconazol em fígados de ratos após a exposição a doses únicas ou subcrônicas *in vivo* (SOMCHIT et al., 2004). Da mesma forma que em nosso estudo, Silva (2016) avaliou a viabilidade celular de leucócitos humanos submetidos à diferentes concentrações de Fluconazol e verificou que nas duas maiores concentrações testadas (60-120 μ g/mL) houve redução significativa da viabilidade das células, quando comparadas ao controle negativo.

Em outros estudos utilizando células *in vitro*, o Fluconazol também apresentou um claro efeito na viabilidade celular, como no estudo realizado por Groppelli et al. (2007). Tais autores demonstraram que o Fluconazol apresentou um efeito dose-dependente na viabilidade celular a partir da concentração de 125 μ M até 5 mM em um modelo animal da espécie *P. mammillata* por 18h de tratamento no teste do MTT. Linhagens de células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) e linhagem de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC) foram expostas a diferentes concentrações de Fluconazol (0,39 μ g/mL a 400 μ g/mL) por 24 horas, e foi observado que o fármaco apresentou efeito na viabilidade apenas nas células CHO-K1, a partir da concentração de 6,25 μ g/mL no teste do MTT (NAMBA, 2011).

Os mecanismos que levam à hepatotoxicidade por azóis mencionada acima nos estudos de Rodriguez e Acosta (1995) e Somchit et al. (2004) são desconhecidos; no entanto, observou-se que o cetoconazol é suscetível ao ataque da FMO (Flavina monoxigenase) na posição N-1 e subsequentemente leva à produção de um metabólito tóxico não identificado (RODRIGUEZ et al., 1999; RODRIGUEZ; ACOSTA, 1995). Segundo Somchit et al. (2002), um mecanismo similar pode ocorrer para hepatotoxicidade induzida por itraconazol ou Fluconazol. O FMO

também foi encontrado em rins humanos, o que levanta uma preocupação em relação à nefrotoxicidade de produtos químicos que sofrem bioativação dependente de FMO (LASH et al., 2003).

Apesar do teste do MTT detectar variações na viabilidade celular, ele não fornece informações sobre os mecanismos que levam a essas variações. Portanto, outros testes devem ser realizados para elucidar tais mecanismos. No presente estudo, usamos corantes fluorescentes para detectar os mecanismos que diminuíram a viabilidade celular, como avaliado pelo teste do MTT. Usando tais corantes, observou-se que o Fluconazol foi capaz de induzir significativamente necrose em células Vero (Figura 10). Não encontramos na literatura trabalhos sobre a citotoxicidade induzida por Fluconazol *in vitro*; entretanto, a citotoxicidade induzida pelo Fluconazol em hepatócitos de ratos *in vitro*, avaliada pelo ensaio do LDH, pode ser atribuída à necrose (SOMCHIT et al. 2002). Na necrose, o rompimento da membrana plasmática da célula resulta na liberação extracelular de enzimas citoplasmáticas, incluindo o LDH, que é uma enzima estável que extravasa em quantidades relativamente altas durante a lesão da membrana plasmática celular (MAES et al., 2015).

Os ensaios para avaliar os efeitos genotóxicos *in vitro* e *in vivo* (teste do cometa, teste do micronúcleo e teste de aberrações cromossômicas) são ferramentas sensíveis para a detecção de genotoxicidade e do potencial carcinogênico de agentes químicos ou físicos (MACGREGOR; CASSIANO; MÜLLER, 2000; TICE et al., 1991; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002). Tais testes avaliam dois pontos de interesse: mutações gênicas e alterações cromossômicas, pois a maioria dos compostos genotóxicos induzem tais alterações genéticas. A indução do dano por agentes químicos pode ser específica ou preferencial para mutação gênica ou alterações cromossômicas (RAO et al., 2004; LAMBERT et al., 2005).

Os agentes genotóxicos afetam negativamente a integridade do material genético de uma célula e são definidos como qualquer substância ou produto químico que danifique o DNA. O fato de determinada substância danificar o DNA não a torna automaticamente um perigo para a saúde. No entanto, é necessário saber se tal substância pode ser potencialmente mutagênica e/ou carcinogênica (SMITH, 1996). Neste sentido, são importantes estudos que definam a segurança e a dose mínima capaz de induzir lesões no material genético do paciente que faz uso de agentes potencialmente genotóxicos, como o Fluconazol.

Até o presente momento, são inexistentes estudos que avaliem os efeitos genotóxicos/mutagênicos do Fluconazol em linhagem Vero. Em nossos resultados, observamos que houve um aumento significativo na frequência de células com micronúcleos (MN) após 24

h de tratamento com Fluconazol, indicando um claro efeito genotóxico desta droga na maior concentração testada (figura 7).

Como mencionado anteriormente, relatos sobre a genotoxicidade do Fluconazol são controversos. Um desses estudos foi realizado por Yüzbaşıoğlu et al. (2008) que avaliaram os efeitos genotóxicos do Fluconazol em testes *in vivo* (aberrações cromossômicas em células de medula óssea de camundongos) e *in vitro* (aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e testes de micronúcleos em linfócitos humanos). Seus resultados mostraram que o Fluconazol não foi clastogênico *in vivo*; no entanto, foi observado um claro efeito do Fluconazol em todos os testes realizados *in vitro*, o que se assemelha ao aumento na taxa de MN observado em nossos experimentos (Figura 7). Os autores também observaram um aumento de MN nas menores concentrações de Fluconazol ($25\mu\text{g} / \text{mL} = 81,6\mu\text{M}$ e $50\mu\text{g} / \text{mL} = 163,2\mu\text{M}$). De fato, alguns relatos mostraram que os linfócitos são mais sensíveis aos efeitos de algumas drogas, em comparação às linhagens celulares estabelecidas (ALCÂNTARA et al., 2013). Micronúcleos induzidos por Fluconazol também foram observados em recém-nascidos após exposição transplacentária (FUCIC et al., 2008; MARKOVIC et al., 2013).

O Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese (IPBC), que permite avaliar atraso no ciclo celular (efeito citostático) nas culturas tratadas, também foi analisado em nossos experimentos. Nossos resultados mostraram que não houve alteração significativa neste parâmetro entre as concentrações testadas de Fluconazol e o controle (tabela 2). De forma semelhante aos nossos resultados, Yüzbaşıoğlu et al. (2008) observaram que o Fluconazol não foi capaz de alterar o IPBC em teste *in vitro*. No entanto, o efeito citostático de outros azóis foi relatado em outros estudos usando técnicas mais precisas. Por exemplo, através de citometria de fluxo e análise de western blot, Chen et al. (2000) observaram que o cetoconazol foi capaz de induzir parada do crescimento na fase G0/G1 em três células cancerígenas (COLO205, HepG2 e HT29), o que provavelmente se deve à diminuição das proteínas CDK4 e ciclina D3. O itraconazol mostrou efeitos semelhantes em células de câncer gástrico (HU et al., 2017).

No que diz respeito ao ensaio do cometa, observamos que o Fluconazol induziu um aumento no índice de danos ao DNA (ID) na linhagem Vero (Figura 8), sendo este aumento significativo na maior concentração testada ($1.306\mu\text{M}$), em relação ao controle negativo. Tais resultados estão em concordância com nossos resultados do teste de micronúcleos, uma vez que em altas concentrações, o Fluconazol também aumentou significativamente a frequência de MN nas células estudadas. Não encontramos trabalhos que tenham investigado os efeitos do Fluconazol pelo teste do cometa. No entanto, outros compostos com atividade antifúngica mostraram efeito no índice de dano de células de mamíferos. Por exemplo, em um estudo

recente, Zhanataev et al. (2017) observaram que o composto antifúngico PLX01107 induz dano ao DNA de fígado de ratos, além de deleções cromossômicas confirmadas nos testes do MN e AC.

Os experimentos realizados para verificar se o Fluconazol induz estresse oxidativo em células Vero mostraram um aumento da quantidade de ERO nas células tratadas com este medicamento (Figura 9). A indução de ERO pelo Fluconazol foi principalmente relatada e observada em células fúngicas (LEE; LEE, 2018; MAHL et al., 2015). No entanto, outros azóis também induziram ERO em células de mamíferos. Por exemplo, o cetoconazol induz lesão hepática em camundongos através da geração de ERO, especificamente através da formação de radical hidroxila, peroxinitrito, ânion superóxido e óxido nítrico. Alguns autores afirmaram que um aumento na mieloperoxidase, que é um dos principais componentes dos grânulos neutrofílicos azurofílicos, pode ser responsável pelo estresse oxidativo observado em seus experimentos (PERIASAMY et al., 2016). Resultados semelhantes foram encontrados por Sozen et al. (2014) que observaram lesão hepática em camundongos acompanhada por um aumento na geração de ERO induzida pelo itraconazol. Eles também avaliaram o dano ao DNA através do ensaio cometa, e descobriram que o itraconazol foi capaz de aumentar o dano ao DNA, o que é comparável aos nossos resultados para o Fluconazol (Figura 9). Sabe-se que o estresse oxidativo induz dano ao DNA, uma vez que as ERO reagem com esta molécula causando quebra de suas cadeias, além de cross-linkings de proteína-DNA e oxidação de purina, o que leva a quebras que podem ser detectadas pelo ensaio do cometa (COLLINS, 2014; MARNETT, 2000; ZONG; THOMPSON, 2006). Portanto, é provável que o aumento na taxa de MN, juntamente com o aumento do ID (observado através do teste do cometa no presente estudo), possam ser devido a danos ao DNA induzidos por ERO em células Vero. Segundo Yüzbaşıoğlu et al. (2008), a genotoxicidade induzida pelo Fluconazol em linfócitos humanos *in vitro* pode ser devida à bioativação do CYP2E1, já que interações químicas com essa enzima produzem radicais livres de oxigênio.

A indução de ERO, juntamente com a atividade de FMO (como discutido acima), também pode explicar a citotoxicidade observada em nossos experimentos (Figura 9). As ERO induzem oxidação lipídica que pode levar à perda de integridade tanto das membranas plasmáticas quanto de membranas intracelulares, como as dos lisossomos, levando a um vazamento intracelular de proteases e, consequentemente, resultando em necrose (ZONG; THOMPSON, 2006). A produção de ERO é um estresse conhecido por contribuir tanto para a apoptose quanto para a necrose (SINHA et al., 2013; ZONG; THOMPSON, 2006). No entanto, embora o Fluconazol apresente propriedades de indução de estresse oxidativo, ele não foi capaz

de induzir apoptose em nossas condições experimentais. Da mesma forma, o Fluconazol não induziu a apoptose em células H295R de carcinoma adrenocortical humano e seu clone HAC15 quando essas células foram tratadas *in vitro* (VAN DER PAS et al., 2012).

Os resultados deste estudo mostraram que o Fluconazol induz alterações citotóxicas e genotóxicas em células Vero. É provável que estes efeitos possam resultar da capacidade do Fluconazol ser um indutor de estresse oxidativo e/ou na presença de FMO nessas células. A principal preocupação relacionada às nossas conclusões é o fato de que o uso indiscriminado de Fluconazol em altas doses por longo período possa desencadear a carcinogênese, uma vez que o acúmulo de sucessivos erros de DNA pode afetar genes relacionados ao controle do ciclo celular, como genes supressores de tumor e proto-oncogenes.

6 CONCLUSÃO

- O Fluconazol apresentou diminuição na viabilidade celular a partir da concentração de 1.306 μ M e estatisticamente significativo na concentração de 2.612,1 μ M nas células Vero em comparação ao controle no teste do MTT;
- O Fluconazol induziu necrose nas células Vero em todas as concentrações testadas nos dois tempos de tratamento testados (24 e 48h);
- O Fluconazol aumentou significativamente o ID ao DNA na maior concentração testada (1.306 μ M) no teste do Cometa em comparação ao controle;
- O Fluconazol induziu a frequência de micronúcleos na maior concentração testada (1.306 μ M) no teste do MN em comparação ao controle;
- O Fluconazol induziu ERO na maior concentração testada (1.306 μ M) em comparação ao controle.

7 REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, D.D.F.Á. et al. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of artemether, an antimalarial drug, in a gastric cancer cell line (PG100). **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 151–156, 2013.
- ALECK, K.A.; BARTLEY, D.L. Multiple malformation syndrome following Fluconazole use in pregnancy: Report of an additional patient. **American Journal of Medical Genetics**, 1997.
- ALLEMAN, I.B.; BAUMANN, L.S. Antioxidantes e as formulações para cuidados com a pele. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r0_03&id_materia=3980>. Acesso em 23 jun. 2018;
- ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A.C.R. *Cultivo Celular*. In: FUNDAÇÃO OWALDO CRUZ (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, v. 2, Cap. 5, Rio de Janeiro, p. 215–253, 2010.
- AMARAL, V.C.D.S.; NUNES, G.P. Ketoconazole- and Fluconazole-induced embryotoxicity and skeletal anomalies in Wistar rats: A comparative study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2008.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 1996.
- ARANA, D.M.; NOMBELA, C.; PLA, J. Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2009.
- AYRES, M. et al. Bioestat 5.0 - *Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. ONG Mamiraua, Belém, PA. 364p, 2007.
- BAI, J.; CEDERBAUM, A.I. Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents by accelerating the degradation of p53. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, 2006.
- BARTKOVA, J. et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**, 2005.
- BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, 1997.

BERNARDINI, S. et al. Glutathione S-transferase PI *C allelic variant increases susceptibility for late-onset Alzheimer disease: Association study and relationship with apolipoprotein E ϵ 4 allele. **Clinical Chemistry**, 2005.

BILSKI, P.; BELANGER, A.G.; CHIGNELL, C.F. Photosensitized oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein: Singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2',7'-dichlorofluorescein. **Free Radical Biology and Medicine**, 2002.

BISWAS, S.J.; PATHAK, S.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Assessment of the genotoxic and cytotoxic potential of an anti-epileptic drug, phenobarbital, in mice: A time course study. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2004.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, 2009.

BRAMBILLA, G. et al. Genotoxicity and carcinogenicity studies of bronchodilators and antiasthma drugs. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, 2013.

BRETAS, R.M. **Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais**. (Dissertação de Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. RJ, 2011.

CALUGI, C.; TRABOCCHI, A.; GUARNA, A. Novel small molecules for the treatment of infections caused by *Candida albicans* : a patent review (2002 – 2010). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 2011.

CARDOSO, P.C. DOS S. et al. *In vitro* assessment of cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of antimalarial drugs artemisinin and artemether in human lymphocytes. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2018.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J. et al. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista Espanola de Quimioterapia**, 2006.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J.C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n.1, p. 39–49, 2006.

CHANG, P.; LI, Y.; LI, D. Micronuclei levels in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker for pancreatic cancer risk. **Carcinogenesis**, 2011.

CHEN, R.-J. et al. Ketoconazole Induces G0/G1 Arrest in Human Colorectal and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.169, n.2, p. 132–141, 2000.

COLLINS, A.R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v.1840, n. 2, p.794–800, 2014.

COLOMBO, A.L. et al. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, 2002.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, v. 24, p. 950–954, 1992.

COOK, P.R.; BRAZELL, I.A. Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA. **Nature**, v. 263, p. 679–82. 1976.

COOK, P.R. et al. Changes induced by ultraviolet light in the superhelical DNA of lymphocytes from subjects with xeroderma pigmentosum and normal controls. **Journal of cell science**, v. 29, p. 117–127, 1978.

CORREIA, J.C.R. et al. Performance characteristics of high performance liquid chromatography, first order derivative UV spectrophotometry and bioassay for Fluconazole determination in capsules. **Quimica Nova**, 2012.

CORVI, R. et al. *EURL ECVAM Strategy to Avoid and Reduce Animal Use in Genotoxicity Testing*, 2013.

CORVI, R.; MADIA, F. *In vitro* genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? **Food and Chemical Toxicology**, 2017.

DA SILVA, C.R. et al. Synergistic effects of amiodarone and Fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2013.

DE LOGU, A. et al. *In vitro* activity of 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and Fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and Fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, n. 5, p. 692–698, 2005.

DE OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quimica Nova**, 2009.

DROSTEN, C. et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. **New England Journal of Medicine**, 2003.

DÜSMAN, E.; BERTI, A.P.; SOARES, L.C.; VICENTINI, V.E.P. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.2, p. 6 –81, 2012.

EL-ZEIN, R.A. et al. Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate. **Cancer Letters**, 2005.

EMBIRUÇU, E.K. et al. Risco teratogênico: a percepção em diferentes segmentos da população. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.4, n.3, p. 201–207, 2005.

ENGELMANN, J. et al. ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, 2005.

ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. Matrix association of early- and late-replicating chromatin studied by single-cell electrophoresis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, 2002.

ERMOLAEVA, M.A.; SCHUMACHER, B. Systemic DNA damage responses: Organismal adaptations to genome instability. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 3, p. 95–102, 2014.

FANOS, V.; CUZZOLIN, L. Causes and manifestations of nephrotoxicity. In: geary & schaefer. **Clinical pediatric nephrology**, Mosby Elsevier, 2008.

FENECH, M. et al. The HUMAN MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 1999.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2000.

FENECH, M. et al. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1–2, p. 65–75, 2003.

FENECH, M. Cytokinesis block MN cytome assay. **Nature Protocols**, 2007.

FERNÁNDEZ FREIRE, P. et al. Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. **Toxicology**, 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 1997.

FERREIRA, G.F. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2013.

FICA, C.A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: Fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Revista chilena de infectología**, v. 21, n. 1, p. 26–38, 2004.

FIRTH, J.M.; HUGHES, P.J. Fluconazole-Associated Birth Defects : A Comprehensive Review. v. 5, n. 2, 2014.

FLORES, M; YAMAGUCHI, U.M. Micronucleus test: an evaluation for genotoxic screening. **Journal of Health Research**, v. 1, p. 337–40, 2008.

FRIDOVICH, I. **Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?** Annals of the New York Academy of Sciences, 1999.

FUCIC, A. et al. Developmental and transplacental genotoxicology: Fluconazole. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 657, n. 1, p. 43–47, 2008.

GILBERT, D.L. Fifty years of radical ideas. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 1–14, 2006.

GOA, K.L.; BARRADELL, L.B. Fluconazole: An Update of its Pharmacodynamic and

Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in Major Superficial and Systemic Mycoses in Immunocompromised Patients. **Drugs**, v. 50, n. 4, p. 658–690, 1995.

GRANT, S.M.; CLISSOLD, S.P. Fluconazole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. **Drugs**, v. 39, p. 877–916, 1990.

GROMOVA, I.I.; RAZIN, S.V.; IAROVAIA, O.V. Specificity and Functional Significance of DNA Interaction with the Nuclear Matrix: New Approaches to Clarify the Old Questions. **International Review of Cytology**, 1996.

GROPPELLI, S. et al. Fluconazole induces teratogenic effects in the tunicate *Phallusia mammillata*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2007.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2006.

HAGIWARA, M. et al. Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: Ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2006.

HASHIMOTO, Y. et al. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator activated receptor γ in human oesophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, 9: 2239–2246. 2003.

HASSEN, W. et al. Heat shock proteins (Hsp 70) response is not systematic to cell stress. Case of the mycotoxin ochratoxin A. **Toxicology**, 2007.

HU, Q.; HOU, Y.C.; HUANG, J.; FANG, J.Y.; XIONG, H. Itraconazole induces apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting Hedgehog signaling in gastric cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, vol. 36, n. 1, 2017.

JACOB, K.D. et al. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. **Mechanisms of Ageing and Development**, 2013.

JOVANOVIĆ, D. et al. A randomized, open-label pharmacokinetic comparison of two oral formulations of Fluconazole 150 mg in healthy adult volunteers. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 10, p. 1588–1595, 2005.

KAUR, G.; DUFOUR, J.M. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. **Spermatogenesis**, v. 2, p. 1–5. 2012.

KIECHLER, F.L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, 326: 27–45. 2002.

KISKINIS, E.; SUTER, W.; HARTMANN, A. High throughput Comet assay using 96-well plates. **Mutagenesis**, 2002.

KLEINSASSER, N.H. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. **Journal of**

Dentistry, 2004.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico guanabara*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.18.18-18.19, 2003.

LAMBERT, I.B. et al. Detailed review of transgenic rodent mutation assays. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, 2005.

LASH, L.H. et al. Roles of Necrosis, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in S-(1,2-Dichlorovinyl)-L-cysteine Sulfoxide-Induced Cytotoxicity in Primary Cultures of Human Renal Proximal Tubular Cells. **Pharmacology and experimental therapeutics**, v. 305, n. 3, p. 1163–1172, 2003.

LEE, B.E.; FEINBERG, M.; ABRAHAM, J.J.M.A. Congenital malformations in an infant born to a woman treated with Fluconazole. **The Pediatric Disease Journal**, 1992.

LEE, W.; LEE, D.G.A novel mechanism of Fluconazole: Fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 164, n. 2, p. 194–204, 2018.

LEITÃO, R.G. *Distribuição Elementar Química em Esferoides. Celulares de Próstata usando Microfluorescência de Raios X*. 105 f. Tese (doutorado) – Curso de engenharia nuclear. Universidade federal do Rio de Janeiro. RJ. 2013.

LIU, D.X.A new hypothesis of pathogenetic mechanism of viral hepatitis B and C. **Medical hypotheses**, v. 56, p. 405–408. 2001.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D.A. Antifungal drug resistance. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, n. Suppl 1, p. S31–S41, 2003.

LOPEZ-RANGEL, E.; VAN ALLEN, M.I. Prenatal exposure to Fluconazole: An identifiable dysmorphic phenotype. **Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology**, 2005.

MACGREGOR, J.T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, 1987.

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

MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective antioxidant nutrients. **Clinical Nutrition**, 1987.

MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, 2004.

MAES, M. et al. Measurement of apoptotic and necrotic cell death in primary hepatocyte cultures. In: **Methods in Molecular Biology**, 2015.

MAHL, C.D. et al. Induction of ROS generation by Fluconazole in *Candida glabrata*:

Activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 3, p. 203–208, 2015.

MAQSOOD, M.I. et al. Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment. **Cell Biology International**, 2013.

MARKOVIC, D. et al. Lipid peroxidation, detoxification capacity, and genome damage in mice after transplacental exposure to pharmaceutical drugs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research scielo**, 2013.

MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 361–370, 2000.

MARTINS, A.K.A.; BOAVENTURA, M.F.C.; LIMA, M.M.R. *Cultivo de linhagens permanentes*. In: Curi R; Peres C. M. **Como cultivar células**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. v. 1. p. 4 –49, 2005.

MASIÁ CANUTO, M. et al. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by Fluconazole-resistant *Candida* strains in HIV-infected patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2000.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, 2006.

MCCULLOUGH, M.J.; ROSS, B.C.; READE, P.C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 25, n. 2, p. 136–144, 1996.

MEIRELES, J.R.C. et al. Genotoxic and cytotoxic effects of testosterone cypionate (deposteron®). **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2013.

MENEGOLA, E. et al. Pathogenic Pathways in Fluconazole-Induced Branchial Arch Malformations. **Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology**, 2003.

MENEGOLA, E. et al. Relationship between hindbrain segmentation, neural crest cell migration and branchial arch abnormalities in rat embryos exposed to Fluconazole and retinoic acid in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 121–130, 2004.

MILLER, D.M.; BUETTNER, G.R.; AUST, S.D. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, 1990.

MOLINARO, E.M. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1* / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

MORAIS, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, R.L. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica*. 1 ed. São Paulo: **Roca**. cap. 1, p. 2–14, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 1983.

NAMBA, V. *Genotoxicidade e indução de apoptose por Fluconazol em células de mamíferos in vitro*. [s.l.] Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular., 2011.

NETO, M.M.; DE CASTRO, J.F.F. Terapêutica das micoses profundas em pacientes transplantados renais. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 18, n. 4, p. 369–374, 1996.

PÉREZ J.M.M. et al. Carbamazepine induces mitotic arrest in mammalian Vero cells. **Mutation Research**, v. 637, p. 124–133, 2008.

PERIASAMY, S. et al. Daily sesame oil supplementation mitigates ketoconazole-induced oxidative stress-mediated apoptosis and hepatic injury. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 37, p. 67–75, 2016.

PURSLEY, T.J. et al. Fluconazole-induced congenital anomalies in three infants. **Clinical Infectious Diseases**, 1996.

RAO, K.S. et al. Mutagenicity Testing Applied for Regulation of Developing Products. **Current Separation**, v. 20, n. 4, p. 141–144, 2004.

RIDNOUR, L.A. et al. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2005.

RISS, T.L. et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

RODRIGUES, H.G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2011.

RODRIGUEZ, R.J.; ACOSTA, D. Comparison of ketoconazole- and Fluconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture-system of rat hepatocytes. **Toxicology**, 1995.

RODRIGUEZ, R.J.; ACOSTA, D. N-Deacetyl ketoconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of rat hepatocytes. **Toxicology**, 1997.

RODRIGUEZ, R.J. et al. Flavin-containing monooxygenase-mediated metabolism of N-deacetyl ketoconazole by rat hepatic microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, n. 8, p. 880–886, 1999.

ROMERO, D. et al. Comparison of cytopathological changes induced by mercury chloride exposure in renal cell lines (VERO and BGM). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2004a.

ROMERO, D. et al. Morphological characterization of renal cell lines (BGM and VERO) exposed to low doses of lead nitrate. **Histology and Histopathology**, 2004b.

ROTA, C.; FANN, Y. C.; MASON, R.P. Phenoxyl free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible

consequences for oxidative stress measurements. **Journal of Biological Chemistry**, 1999.

SALMON, A.B.; RICHARDSON, A.; PÉREZ, V.I. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? **Free Radical Biology and Medicine**, 2010.

SCARPATO, R. et al. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the γ H2AX focus assay and micronucleus test. **The FASEB journal**, v. 25, n.2, p. 685–693, 2011.

SCHÜLER-FACCINI, L. et al. Avaliação de teratógenos na população brasileira - O problema. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 65–71, 2002.

SHARMA, R. et al. Transport of glutathione-conjugates in human erythrocytes. **Acta Biochimica Polonica**, 2000.

SHEETS, R. History and characterization of the Vero cell line. **Vaccines and Related Products Advisory Committee**, p. 1–12, 2000.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

SILVA, G.S. *Efeitos genotóxicos e citotóxicos ex vivo do antifúngico Fluconazol em leucócitos humanos*. Dissertação, 2016.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, p.422, 2003.

SILVEIRA, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 812–822, 2004.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 1988.

SINHA, K. et al. Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives of Toxicology**, 2013.

SMITH, M.T. The mechanism of benzene-induced leukemia: A hypothesis and speculations on the causes of leukemia. **Environmental Health Perspectives**, 1996

SNYDER, R.D.; GREEN, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. Mutation Research - **Reviews in Mutation Research**, 2001.

SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. **Lanceta**, v. 369, p. 1961-1971. 2007.

SOMCHIT, N.; HASSIM, S.M.; SAMSUDIN, S.H. Itraconazole- and Fluconazole-induced toxicity in rat hepatocytes: A comparative *in vitro* study. **Human and Experimental Toxicology**, 2002.

SOMCHIT, N. et al. Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and Fluconazole in rats: A comparative in vivo study. **Human and Experimental Toxicology**, v. 23, n. 11, p. 519–525, 2004.

SOZEN, H. et al. Evaluation of the Protective Effect of Silibinin in Rats with Liver Damage Caused by Itraconazole. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 71, n. 2, p. 1215–1223, 2014.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections , Causes , Targets , and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–13, 2013.

SWANSON, S.K. et al. Characterization of Vero cells. **Journal of Biological Standardization**, v. 16, n. 4, 1988.

TAKATA, C.S. et al. Suscetibilidade Da Linhagem De Células Vero a Cepas Vacinais Do Vírus Do Sarampo. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 209–212, 1994.

TAPIA P, C. et al. Susceptibilidad antifúngica de *Candida albicans* recuperadas de pacientes con SIDA y candidiasis orofaríngea y esofágica. Experiencia con Etest®. **Revista Medica de Chile**, 2003.

THIERENS, H.; VRAL, A. The micronucleus assay in radiation accidents. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, 2009.

TIBONI, G.M. Second branchial arch anomalies induced by Fluconazole, a bis-triazole antifungal agent, in cultured mouse embryos. **Research communications in chemical pathology and pharmacology**, v. 79, n. 3, p. 381–4, 1993.

TICE, R.R. et al. The Single Cell Gel (SCG) Assay: An Electrophoretic Technique for the Detection of DNA Damage in Individual Cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 283, p. 157-164, 1991.

TIWARI, A. et al. Permissibility of different cell types for the growth of avian metapneumovirus. **Journal of Virological Methods**, 2006.

UNCHERN, S. Basic Techniques in Animal Cell Culture. n. January, p. 1–30, 1999.

VALADARES, M.C.; CASTRO, N.C. DE.; CUNHA, L.C. DE. Synadenium umbellatum : citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v. 43, n. 4, p. 631–638, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2007.

VAN CAUTEREN, H. et al. Safety aspects of oral antifungal agents. **British journal of clinical practice. Supplement**, v. 71, p. 47–9. 1990.

VAN DER PAS, R. et al. Fluconazole inhibits human adrenocortical steroidogenesis *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v. 215, n. 3, p. 403–412, 2012.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.5, p.1323–1338, 2007.

VAZQUEZ, J.A. Options for the management of mucosal candidiasis in patients with AIDS and HIV infection. **Pharmacotherapy**, v. 19, n. 1, p. 76–87, 1999.

VIRGINIO, C.G.; TEIXEIRA, M.F.S. Use of TIGEF cell lines for culture and production of sheep lentivirus. **Ciência Animal**, v. 14, n. 2, p. 69–75, 2004.

VOGELSTEIN, B.; PARDOLL, D.M.; COFFEY, D.S. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. **Cell**, 1980.

YOKOMIZO, A.Y. Obtenção de Antígeno Viral a partir de culturas de células VERO em microcarregadores porosos, p. 1–114, 2001.

YU, M. et al. Characterization of a small round virus associated with the poult enteritis and mortality syndrome, **Avian Diseases**, v.44, n.3, p.600, 2000.

YÜZBAŞIOĞLU, D. et al. Genotoxicity testing of Fluconazole *in vivo* and *in vitro*. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2008.

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

ZHANATAEV, A.K. et al. Genotoxicity of two new carbazole derivatives with antifungal activity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 816–817, p. 24–31, 2017.

ZONG, W.-X.; THOMPSON, C.B. Necrotic death as a cell fate. **Genes & development**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2006.

Research Article

Cytotoxic and Genotoxic Effects of Fluconazole on African Green Monkey Kidney (Vero) Cell Line

Regianne Maciel dos Santos Correa , Tatiane Cristina Mota, Adriana Costa Guimarães, Laís Teixeira Bonfim , Rommel Rodriguez Burbano, and Marcelo de Oliveira Bahia 

Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil

Correspondence should be addressed to Marcelo de Oliveira Bahia; mbahia@ufpa.br

Received 6 August 2018; Revised 17 September 2018; Accepted 18 October 2018; Published 1 November 2018

Academic Editor: Paul W. Doetsch

Copyright © 2018 Regianne Maciel dos Santos Correa et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Fluconazole is a broad-spectrum triazole antifungal that is well-established as the first-line treatment for *Candida albicans* infections. Despite its extensive use, reports on its genotoxic/mutagenic effects are controversial; therefore, further studies are needed to better clarify such effects. African green monkey kidney (Vero) cells were exposed *in vitro* to different concentrations of fluconazole and were then evaluated for different parameters, such as cytotoxicity (MTT/cell death by fluorescent dyes), genotoxicity/mutagenicity (comet assay/micronucleus test), and induction of oxidative stress (DCFH-DA assay). Fluconazole was used at concentrations of 81.6, 163.2, 326.5, 653, 1306, and 2612.1 μM for the MTT assay and 81.6, 326.5, and 1306 μM for the remaining assays. MTT results showed that cell viability reduced upon exposure to fluconazole concentration of 1306 μM (85.93%), being statistically significant ($P < 0.05$) at fluconazole concentration of 2612.1 μM (35.25%), as compared with the control (100%). Fluconazole also induced necrosis ($P < 0.05$) in Vero cell line when cells were exposed to all concentrations (81.6, 326.5, and 1306 μM) for both tested harvest times (24 and 48 h) as compared with the negative control. Regarding genotoxicity/mutagenicity, results showed fluconazole to increase significantly ($P < 0.05$) DNA damage index, as assessed by comet assay, at 1306 μM versus the negative control (DI=1.17 vs DI=0.28, respectively). Micronucleus frequency also increased until reaching statistical significance ($P < 0.05$) at 1306 μM fluconazole (with 42MN/1000 binucleated cells) as compared to the negative control (13MN/1000 binucleated cells). Finally, significant formation of reactive oxygen species ($P < 0.05$) was observed at 1306 μM fluconazole vs the negative control (OD=40.9 vs OD=32.3, respectively). Our experiments showed that fluconazole is cytotoxic and genotoxic in the assessed conditions. It is likely that such effects may be due to the oxidative properties of fluconazole and/or the presence of FMO (flavin-containing monooxygenase) in Vero cells.

1. Introduction

Fluconazole is a broad-spectrum triazole antifungal drug and is, therefore, used to treat infections caused by various pathogenic fungi [1]. Its mechanism of action is based on inhibition of the oxidative enzyme lanosterol 14- α -demethylase, which is associated with cytochrome P450 and is essential in the bioregulation of fluidity, asymmetry, and integrity of the cellular membrane [2]. It is well-established as the first line of treatment for systemic *Candida albicans* infections [3], and it is, hence, an important drug in the areas of obstetrics and gynecology for the treatment of vaginal candidiasis. It is also used in patients with compromised immunity, such as those with acquired immunodeficiency syndrome and

those with neutropenia due to chemotherapy for cancer. Such patients are at risk of developing *Candida albicans* infection, which can progress into a systemic infection [4, 5]. Despite its importance, its teratogenic effects in newborns, embryotoxicity in animals after drug administration, and passage into breast milk have been reported [2, 6, 7].

Reports on the genotoxic/mutagenic effects of fluconazole are controversial. For example, fluconazole did not increase the frequency of chromosomal aberrations in rat's bone marrow *in vivo*. However, in *in vitro* test, it induced significantly high frequencies of chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, and micronuclei formation in peripheral blood lymphocytes [8].

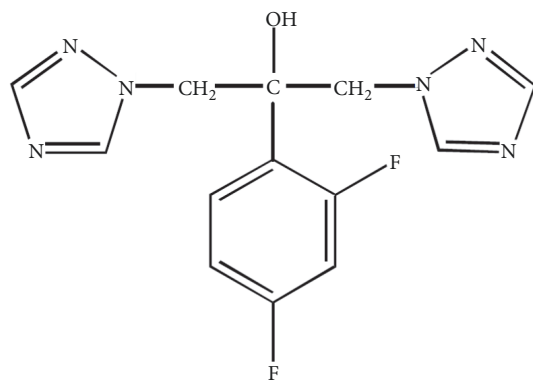


FIGURE 1: Chemical structure of fluconazole.

Given the scarcity of studies dealing with the genotoxicity of fluconazole, together with the need to study these effects in different test systems [8], we decided to increase the existing knowledge by evaluating the genotoxic effects of fluconazole allied to parameters, such as cytotoxicity and induction of oxidative stress on an African green monkey kidney (Vero) cell line, through comet and micronuclei assays.

2. Materials and Methods

2.1. Chemical Compounds. Pure-grade fluconazole (CAS: 86386-73-4) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The chemical structure of fluconazole (2-(2,4-difluorophenyl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-propanol) is presented in Figure 1. The drug was dissolved in pure-grade dimethylsulfoxide (DMSO) (CAS 67-68-5, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) to achieve a less than 1% (v/v) DMSO final concentration in the cultures. N-methyl-N-nitrosourea (NMU) (CAS 684-93-5) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and was diluted in DMSO as well.

2.2. Cell Culture. The Vero cell line was commercially obtained from Rio de Janeiro, Brazil cell bank. Vero cells are isolated from kidney epithelial cells of the African green monkey [9]. These cells were grown in Dulbecco's modified eagle's medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 15% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA), streptomycin (0.1mg ml⁻¹), and penicillin (99 Uml⁻¹) and were kept in an incubator at 37°C and 5% CO₂. Cells were subcultured two or three times a week.

2.3. MTT Assay. For the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, Vero cells were grown in 96-well culture plates at a concentration of 0.008×10^6 cells/well and were incubated for 24 hours. After the initial period of incubation, cells were treated with different concentrations of fluconazole for 24 hours. Then, 100 μ L of MTT (5000 μ g/mL) was added to the cells for 3 hours. Next, the MTT was removed, and 100 μ L of DMSO (Sigma®) was added for 1 hour to dissolve the formazan formed during the process. Afterwards, DMSO was measured by spectrophotometry ($\lambda=562$ nm). Cell survival was calculated as the absorbance

percentage compared to the control absorbance. The fluconazole concentrations used in the experiment were 81.6, 163.2, 326.5, 653, 1306, and 2612.1 μ M. These concentrations were chosen based on previous experiments carried out *in vitro* [8]. However, clinical studies showed that the maximum fluconazole concentration observed in volunteers was tenfold lower than the lowest concentration (81.6 μ M) used in the present study [10].

2.4. Micronucleus Test. Vero cells were treated with fluconazole for 24 h in 25-cm² sterile flasks (Corning) at a concentration of 1×10^6 cells/mL. After treatment, 3- μ g/mL cytochalasin B (Sigma Chemical Co.) was added for another 24 hours at 37°C. The cells were harvested, centrifuged for 5 minutes at 800 rpm, and treated with 5-mL hypotonic solution (KCl 0.075 M). Afterwards, the cells were washed once with 5-mL 5:1 (v/v) and twice with 5-mL 3:1 (v/v) cold methanol:acetic acid solution. The slides were prepared and stained with 5% Giemsa dye (Sigma Chemical Co.) in phosphate buffer solution (PBS), pH 6.8, for 5 minutes. Micronuclei (MN) were scored in 1000 binucleated cells using the criteria adopted from the study by Fenech et al. [11]. The frequency of binucleated cells containing one or more MN was also determined. As a measure of cytotoxicity, the cytokinesis-block proliferating index (CBPI) was calculated according to the following formula: $CBPI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$, where M1-M4 represents the number of cells with 1-4 nuclei per 500 cells. As previously mentioned, the fluconazole concentrations used were 81.6, 326.5, and 1306 μ M. NMU, which is a known carcinogenic alkylating agent, was used as the positive control, with final concentration of 1212.6 μ M. The single NMU concentration was defined according to previous MTT assays performed in our laboratory (data not shown).

2.5. Comet Assay (Alkaline Version). For the alkaline version of the comet assay, Vero cells were grown in 25-cm² sterile flasks (Corning) at a concentration of 1×10^6 cells/mL and were treated with different concentrations of fluconazole (81.6, 326.5, and 1306 μ M) for 3 hours. NMU (1212.6 μ M) was used as the positive control. After treatment, 450 μ L of the cell suspension was homogenized with 300 μ L of a low-melting-point agarose (0.8%). The cell suspension was spread onto microscope slides precoated with a normal-melting-point agarose (1.5%) and was covered with a coverslip (24x60mm). After 5 minutes at 4°C, the coverslip was removed, and the slides were immersed in cold lysis solution (2.5M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris, 10% DMSO, and 1% Triton-X; pH=10). After lysis, the slides were placed in an electrophoresis chamber and were covered with freshly made electrophoresis buffer (300mM NaOH and 1mM EDTA; pH>13). The electrophoresis was run for 25 minutes (34V and 300 mA). Afterwards, the slides were neutralized through submersion in distilled water (4°C) for 5 minutes and were fixed in 100% ethanol for 3 minutes. The slides were stained with 20- μ g/mL ethidium bromide immediately prior to analyses and were prepared in duplicate. One-hundred cells, or 50 cells from each slide, were screened per sample

using a fluorescence microscope (Olympus BX41) at 40x magnification. The DNA damage index (DI), or the relative intensity of fluorescence in the comet's tail with regard to frequency of DNA breaks, was visually determined, and the following five categories (0-4) were used: class 0 (no damage); class 1 (little damage with tail length shorter than the nucleus diameter); class 2 (medium damage with tail length one or two times greater than the nucleus diameter); class 3 (significant damage with tail length one or two times greater than the nucleus diameter); and class 4 (significant damage with tail length three times greater than the nucleus diameter). Moreover, DI was determined by the following formula:

$$DI (au): \frac{[(N1 * 1 + N2 * 2 + N3 * 3 + N4 * 4)]}{100 (total\ number\ of\ analyzed\ cells)} \quad (1)$$

where DI is DNA damage index, au is arbitrary unit, and N1-N4 are cells in classes 1, 2, 3, and 4.

2.6. Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA) Assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) generation was evaluated using the fluorescent probe dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Vero cells were grown in sterile 6-well culture plates (Corning) (0.5×10^6 cells/well) and were exposed to fluconazole at different concentrations (81.6, 326.5 and $1306 \mu\text{M}$) for 1 hour at 37°C . Thereafter, the cells were collected by centrifugation and were washed with PBS at 1000 rpm for 5 minutes. After the second centrifugation, the cells were suspended in PBS, and DCFH-DA was added to a final concentration of $10 \mu\text{M}$. The suspension was incubated in the dark for 30 minutes at 37°C . After another washing with PBS, the samples were analyzed by spectrophotometry with an emission wavelength of 528 nm and an excitation wavelength of 485 nm. Hydrogen peroxide (2mM) was used as the positive control.

2.7. Evaluation of Necrosis and Apoptosis by Fluorescent Differential Staining with Hoechst 33342/Propidium Iodide (PI)/Fluorescein Diacetate (FDA). To evaluate apoptosis and necrosis of Vero cells, 0.5×10^6 cells were seeded in 6-well culture plates (Corning) with complete medium. After 24 hours, the cells were treated with different concentrations of fluconazole (81.6, 326.5, and $1306 \mu\text{M}$) for 24 and 48 hours. NMU ($1.212.6 \mu\text{M}$) was used as the positive control. The cells were then trypsinized, and $100 \mu\text{L}$ of cell suspension was mixed with a previously prepared solution of Hoechst 33342/Propidium Iodide (PI)/Fluorescein Diacetate (FDA) ($100 \mu\text{L}$ dying solution of $25 \mu\text{L}$ PI 1 mg/ml in distilled water + $50 \mu\text{L}$ FDA in 1.5 mg/mL DMSO + $10 \mu\text{L}$ Hoechst 33342 [HO] in 1 mg/mL distilled water + $15 \mu\text{L}$ PBS [pH= 8.0]) after centrifugation. The cells were incubated with dyes for 5 minutes in bath water and were subsequently analyzed using an Olympus BX41 fluorescence microscope with triple filter DAPI/FITC/TRITC [DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole); FITC (fluorescein isothiocyanate); TRITC (tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate)]. Three hundred cells were analyzed for each treatment group according to the criteria used by Hashimoto et al. [12].

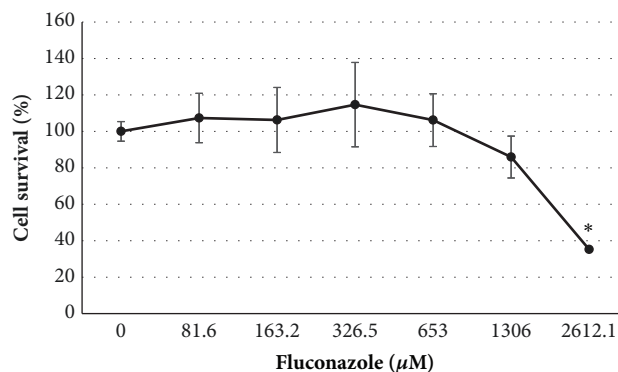


FIGURE 2: Effects of fluconazole in Vero cells analyzed by MTT assay. * $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis/Dunn posttest) when compared with control. Data are expressed as the mean values obtained from three experiments in duplicate.

2.8. Statistical Analysis. Statistical analysis was performed by using the BIOSTAT 5.0 software with P values < 0.05 considered significant [13]. For parametric data sets, statistical analysis was performed using ANOVA, followed by the Tukey test. For nonparametric data sets, we used Kruskal-Wallis test followed by Dunn test.

3. Results

3.1. MTT Assay. The results of MTT assay, which was assessed 24 hours after treatment with fluconazole, demonstrated a decrease in the survival percentages upon exposure to fluconazole concentration of $1306 \mu\text{M}$ (85.93%); such decrease in survival was found to be statistically significant at fluconazole concentration of $2612.1 \mu\text{M}$ (35.25%), as compared with the control (100%). In addition, significant differences were observed in the following comparisons: $81.6 \mu\text{M}$ (107.34%) vs $2612.1 \mu\text{M}$ (35.25%); $163.2 \mu\text{M}$ (106.27%) vs $2612.1 \mu\text{M}$ (35.25%); $326.5 \mu\text{M}$ (114.68%) vs $2612.1 \mu\text{M}$ (35.25%); and $652.8 \mu\text{M}$ (106.19%) vs $2612.1 \mu\text{M}$ (35.25%) (Figure 2).

3.2. Micronucleus Test. MN tests showed an increase in the frequency of micronuclei induced by fluconazole. For every 1000 binucleated cells analyzed at fluconazole concentrations of 81.6, 326.5, and $1306 \mu\text{M}$, the corresponding mean frequencies of MN were 19, 23, and 42, respectively. Statistical significance ($P < 0.05$) was observed at $1306 \mu\text{M}$ fluconazole as compared to the negative control, with 42 MN/1000 and 13 MN/1000 binucleated cells, respectively. NMU-treated cells demonstrated a mean frequency of 32 MN/1000 binucleated cells, which was also statistically significant ($P < 0.05$) as compared to the negative control (Figure 3). CBPI mean frequencies did not significantly differ between the negative control and the treated groups (Table 1). The concentrations used in the MN, comet, and DCFH-DA assays and in the evaluation of necrosis and apoptosis by fluorescent differential staining were defined based on the results of cell viability. The chosen concentrations had a viability percentage greater than 50% as compared with that of the control.

TABLE 1: Cytokinesis-block proliferating index (CBPI) observed in Vero cell line after exposure to different concentrations of fluconazole.

Experiment	Cytokinesis-block proliferating index (CBPI)				
	NMU	Control	Fluconazole (μM)		
			81.6	326.5	1306
1°	1.222	1.442	1.268	1.396	1.424
2°	1.330	1.364	1.268	1.396	1.424
3°	1.280	1.240	1.420	1.340	1.270
Mean	1.277	1.349	1.319	1.377	1.373
Standard deviation	+/- 0.05	+/- 0.10	+/-0.09	+/- 0.03	+/- 0.09

* $P > 0.05$ (ANOVA). Mean of three experiments.

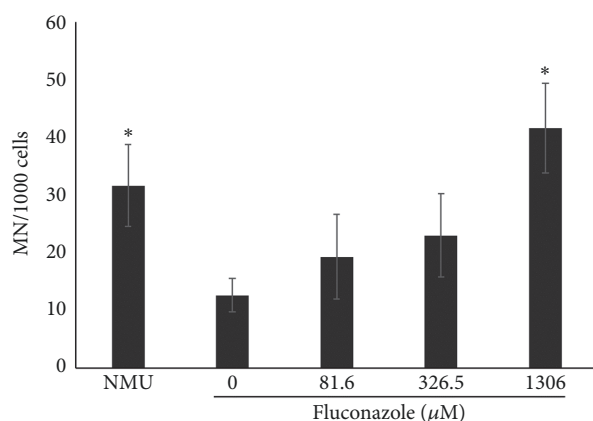


FIGURE 3: Micronucleus frequency observed in Vero cell line after exposition to different concentrations of fluconazole for 24 h. * $P < 0.05$ related to control (ANOVA/Tukey posttest). Data are expressed as the mean values obtained from three experiments.

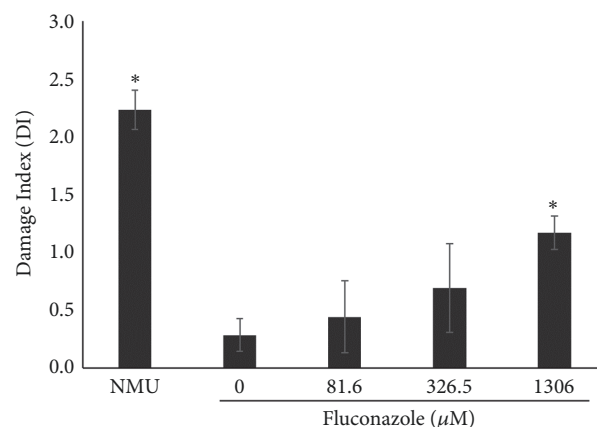


FIGURE 4: Effects of fluconazole in Vero cell line analyzed by comet assay. * $P < 0.05$ (ANOVA/Tukey posttest) when compared with control. Data are expressed as the mean values obtained from three experiments.

3.3. Comet Assay (Alkaline Version). The results of comet assay, which was assessed after treatment with fluconazole, showed a dose-dependent increase in DNA DI of Vero cell line. For every 100 cells analyzed at fluconazole concentrations of 81.6, 326.5, and 1306 μM , the corresponding DIs were 0.44, 0.69, and 1.17, respectively. Statistical significance ($P < 0.05$) was observed at 1306 μM versus the negative control (DI=1.17 vs DI=0.28, respectively). NMU-treated cells showed a DI=2.23, which was also statistically significant ($P < 0.05$) when compared to that of the negative control. Furthermore, the DI of NMU-treated cells was also statistically significant ($P < 0.05$) when compared to all concentrations of fluconazole (Figure 4).

3.4. ROS Generation. ROS generation was assessed after treatment with fluconazole by DCFH-DA assay, and optical density (OD) means of 36.1, 35.7, and 40.9 were observed at fluconazole concentrations of 81.6, 326.5, and 1306 μM , respectively. Statistical significance ($P < 0.05$) was observed at 1306 μM concentration vs the negative control (OD=40.9 vs OD=32.3, respectively). Cells treated with H_2O_2 had an OD of 54.5, which was also statistically significant ($P < 0.05$) when compared to the negative control. The OD of H_2O_2 -treated cells was also statistically significant ($P < 0.05$) when compared to all concentrations of fluconazole (Figure 5).

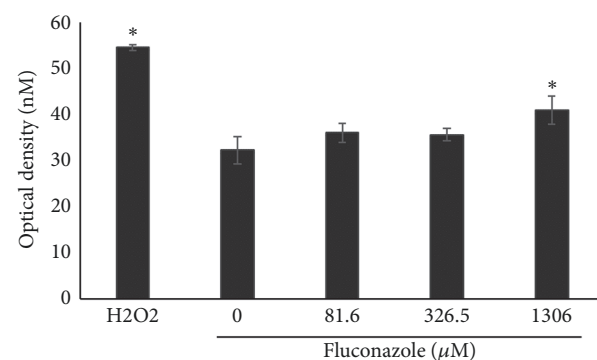


FIGURE 5: ROS generation induced by fluconazole in Vero cell line. * $P < 0.05$ (ANOVA/Tukey posttest) when compared with control. Data are expressed as the mean values obtained from three experiments.

3.5. Evaluation of Apoptosis and Necrosis Using Differential Fluorescent Staining with Hoechst 33342/Propidium Iodide (PI)/Fluorescein Diacetate (FDA). In our experimental conditions, fluconazole induced necrosis ($P < 0.05$) in Vero cell line when cells were exposed to all concentrations (81.6, 326.5, and 1306 μM) for both tested harvest times (24 and 48 h) as compared with the negative control. NMU-treated

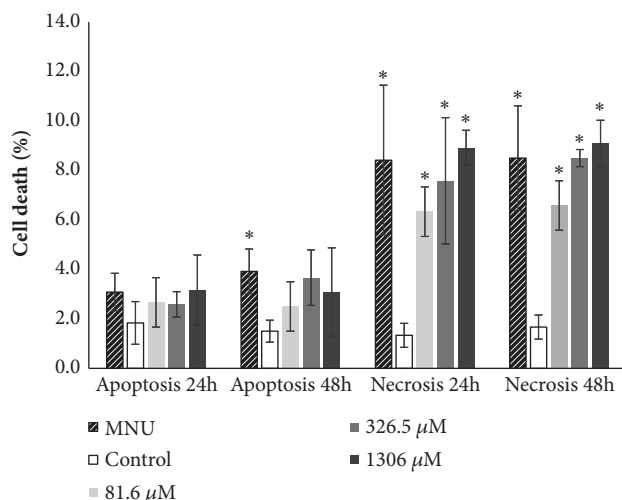


FIGURE 6: Effects of fluconazole in Vero cell line analyzed by differential fluorescent staining. * $P < 0.05$ (ANOVA/Tukey posttest and Kruskal–Wallis/Dunn posttest) when compared with control. Data are expressed as the mean values obtained from four experiments.

cells also underwent significant apoptosis, when compared with the negative control, after 48 hours of treatment. Even though fluconazole was not able to induce apoptosis in our experimental conditions, a significant increase in this kind of cell death was observed when cells were exposed to NMU, as compared to the negative control, after 48 hours of treatment (Figure 6).

4. Discussion

Albeit fluconazole is widely used as an antifungal agent, studies on its genotoxicity/cytotoxicity are controversial. Therefore, this study aims to contribute to and increase the existing knowledge on such effects. Regarding cell viability, our results showed that fluconazole can induce a significant decrease in such endpoint in our experimental conditions (Figure 2). However, Rodriguez et al. [14] observed that fluconazole was not able to reduce cell viability in a primary culture system of rat hepatocytes through an MTT assay, though the authors showed that ketoconazole, which is another azole antifungal agent, was able to decrease cell viability through MTT assay, within a 25–200 μM concentration range. In their study, short-treated (0.5–6 hours) rat hepatocytes were exposed to lower concentrations of fluconazole (100–1000 μM), whereas, in our experiments, fluconazole concentrations of 81.6–2612.1 μM were administered for 24 hours. De Logu et al. [15] also tested the effects of fluconazole after a 72-hour treatment of Vero cells using MTT; surprisingly, they did not observe a decrease in cell viability even with concentrations as high as 1000 mg/mL (3265.08 μM). In some papers, fluconazole has demonstrated a clear cytotoxic effect, in the same way as what we have observed in our experiments, although such effect was less significant when compared to other azoles. For example, Somchit et al. [16] showed that itraconazole induced a higher cytotoxicity in rat hepatocytes *in vitro* through the lactate dehydrogenase (LDH) activity assay when

compared to fluconazole. A lesser cytotoxicity induced by fluconazole, as compared to itraconazole, was also observed in the livers of rats upon exposure to either single or subchronic doses *in vivo* [17]. The mechanisms that lead to azole hepatotoxicity are largely unknown; however, it was observed that ketoconazole is susceptible to FMO (flavin-containing monooxygenase) attack on the N-1 position and subsequently leads to the production of an unidentified toxic metabolite [18, 19]. According to Somchit et al. [16], a similar mechanism may occur for itraconazole- or fluconazole-induced hepatotoxicity. FMO is also found in human kidneys which raises a concern with regard to nephrotoxicity from chemicals that undergo FMO-dependent bioactivation [20].

MTT assay detects variations in cell viability; however, it does not supply information about the mechanisms that lead to such variations. Therefore, other tests should be carried out to elucidate such mechanisms. In the present study, we used fluorescent dyes to detect the mechanisms that decreased cell viability as assessed with the MTT assay. Using such dyes, we observed that fluconazole was able to significantly induce necrosis in Vero cells (Figure 6). We were not able to find studies on fluconazole-induced cytotoxicity *in vitro*; however, the cytotoxicity induced by fluconazole in rat hepatocytes *in vitro* as assessed with LDH assay may be attributed to necrosis [16]. In necrosis, disruption of the cell plasma membrane results in extracellular release of cytoplasmic enzymes, including LDH, which is a stable enzyme that leaks in relatively high amounts during cell plasma membrane damage [21].

As already stated, reports on genotoxicity of fluconazole are controversial. One of such studies was carried out by Yüzbaşıoğlu et al. [8]. They assessed the genotoxic effects of fluconazole using both *in vivo* (chromosome aberrations in mouse bone-marrow cells) and *in vitro* (chromosome aberration, sister-chromatid exchange, and micronucleus tests in human lymphocytes) systems. Their results showed that fluconazole was not clastogenic *in vivo*; however, an increase in all endpoints assessed *in vitro* was observed, which is comparable to the increase in MN rate as observed in our experiments (Figure 3). The authors observed MN increase with lower concentrations of fluconazole (25 $\mu\text{g/mL}$ = 81.6 μM and 50 $\mu\text{g/mL}$ = 163.2 μM). In fact, some reports showed that lymphocytes are more sensitive to the effects of some drugs as compared to established cell lines [22]. Yüzbaşıoğlu et al. [8] also observed that *in vitro* treatment with fluconazole was not able to change CBPI, which is in line with our results (Table 1). However, the cytostatic effect of other azoles was reported in other studies using more accurate techniques. For example, through flow cytometry and western blot analysis, Chen et al. [23] observed that ketoconazole was able to induce growth arrest in G0/G1 phase in three cancer cells (COLO 205, Hep G2, and HT 29), which is probably due to decrease in cyclin D3 and CDK4 proteins. Itraconazole showed similar effects in gastric cancer cells [24]. Fluconazole-induced MN was also observed in newborn pups after transplacental exposure [25, 26].

In the current study, we observed an increase in ROS induced by fluconazole in Vero cells (Figure 5). Induction of ROS by fluconazole was mainly reported and observed in

fungal cells [27, 28]. However, other azoles induce ROS in mammalian cells as well. For example, ketoconazole induces hepatic injury in mice through ROS generation, specifically through the formation of hydroxyl radical, peroxynitrite, superoxide anion, and nitric oxide. Some authors stated that an increase in myeloperoxidase, which is a major component of azurophilic neutrophil granules, may be responsible for oxidative stress observed in their experiments [29]. Similar results were found by Sozen et al. [30], as they observed hepatic injury in mice that was accompanied by an increase in ROS generation induced by itraconazole. They also assessed DNA damage through comet assay, and they found that itraconazole was able to increase DNA damage, which is comparable to our results for fluconazole (Figure 4). It is known that oxidative stress induces DNA damage, as ROS reacts with DNA thus causing cleavage of DNA strands, DNA-protein cross-linking, and purine oxidation, which ultimately lead to breaks that may be assessed by the comet assay [31–33]. Therefore, it is likely that the increase in the rate of MN, together with the increase in DI, as observed through comet assay in the present study, may be due to the reactions of DNA damage-induced ROS in Vero cells. According to Yüzbaşıoğlu et al. [8], fluconazole-induced genotoxicity in human lymphocytes *in vitro* may be due to bioactivation of CYP2E1, as chemical interactions with this enzyme produce free oxygen radicals.

ROS induction, together with FMO activity (as discussed above), may also explain the cytotoxicity observed in our experiments (Figure 6). ROS induces lipid oxidation that can lead to the loss of integrity of both plasma and intracellular membranes, such as lysosomes, leading to an intracellular leak of proteases and consequently resulting in necrosis [34]. ROS production is a stress stimulus known to contribute to both apoptosis and necrosis [34, 35]. Nevertheless, although fluconazole exhibits oxidative stress-inducing properties, it was not able to induce apoptosis in our experimental conditions. Moreover, fluconazole failed to induce apoptosis in human adrenocortical carcinoma H295R cells and its clone HAC15 when such cells were treated *in vitro* [36].

In brief, the results of this study showed that fluconazole induces cytotoxic and genotoxic alterations in Vero cells. It is likely that these effects may arise from the ability of fluconazole to be an oxidative stress inducer and/or the presence of FMO in such cells. The main concern related to our conclusions is the fact that the indiscriminate use of fluconazole in high doses for a long period of time could trigger carcinogenesis, since the accumulation of successive DNA errors may affect genes related to cell cycle control, such as tumor-suppressor genes and protooncogenes.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

Disclosure

A preliminary version of this article was presented as poster in II Latin-American Congress of Clinical and

Laboratorial Toxicology (Toxilatín, 2018) held in Porto Alegre, Brazil.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)), Coordination of Improvement of Higher Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)), and Amazônia Paraense Foundation for Support to Research (Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA)).

References

- [1] M. Moysés Neto and J. F. C. Figueredo, “Terapêutica das micoses profundas em pacientes transplantados renais,” *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, vol. 18, pp. 369–374, 1996.
- [2] M. Catalán and J. C. Montejo, “Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética,” *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. 23, no. 1, pp. 39–49, 2006.
- [3] K. L. Goa and L. B. Barradell, “Fluconazole: An Update of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in Major Superficial and Systemic Mycoses in Immunocompromised Patients,” *Drugs*, vol. 50, no. 4, pp. 658–690, 1995.
- [4] M. McCullough, B. Ross, and P. Reade, “*Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation,” *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 25, no. 2, pp. 136–144, 1996.
- [5] J. A. Vazquez, “Options for the management of mucosal candidiasis in patients with AIDS and HIV infection,” *Pharmacotherapy*, vol. 19, no. 1 I, pp. 76–87, 1999.
- [6] G. M. Tiboni, “Second branchial arch anomalies induced by fluconazole, a bis-triazole antifungal agent,” *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, vol. 79, no. 3, p. 3814, 1993.
- [7] E. Menegola, M. L. Broccia, F. Di Renzo, V. Massa, and E. Giavini, “Relationship between hindbrain segmentation, neural crest cell migration and branchial arch abnormalities in rat embryos exposed to fluconazole and retinoic acid *in vitro*,” *Reproductive Toxicology*, vol. 18, no. 1, pp. 121–130, 2004.
- [8] D. Yüzbaşıoğlu, F. Ünal, S. Yilmaz, H. Aksoy, and M. Çelik, “Genotoxicity testing of fluconazole *in vivo* and *in vitro*,” *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 649, no. 1-2, pp. 155–160, 2008.
- [9] Y. Yasumura, “The research for the SV40 by means of tissue culture technique,” *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, vol. 21, pp. 1201–1215, 1963.
- [10] D. Jovanović, V. Kilbarda, B. Ćirić et al., “A randomized, open-label pharmacokinetic comparison of two oral formulations of fluconazole 150 mg in healthy adult volunteers,” *Clinical Therapeutics*, vol. 27, no. 10, pp. 1588–1595, 2005.
- [11] M. Fenech, W. P. Chang, M. Kirsch-Volders, N. Holland, S. Bonassi, and E. Zeiger, “HUMN project: detailed description

- of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures,” *Mutation Research*, vol. 534, no. 1-2, pp. 65–75, 2003.
- [12] Y. Hashimoto, Y. Shimada, A. Itami et al., “Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human oesophageal squamous cell carcinoma,” *European Journal of Cancer*, vol. 39, no. 15, pp. 2239–2246, 2003.
 - [13] M. Ayres, M. J. Ayres Júnior, D. M. Ayres et al., *Biostat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*, Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 5th edition, 2007.
 - [14] R. J. Rodriguez and D. Acosta Jr., “Comparison of ketoconazole- and fluconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of rat hepatocytes,” *Toxicology*, vol. 96, no. 2, pp. 83–92, 1995.
 - [15] A. De Logu, M. Saddi, M. C. Cardia et al., “In vitro activity of 2-cyclohexyldienhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 55, no. 5, pp. 692–698, 2005.
 - [16] N. Somchit, S. M. Hassim, and S. H. Samsudin, “Itraconazole and fluconazole-induced toxicity in rat hepatocytes: a comparative in vitro study,” *Human & Experimental Toxicology*, vol. 21, no. 1, pp. 43–48, 2002.
 - [17] N. Somchit, A. R. Norshahida, A. H. Hasiah, A. Zuraini, M. R. Sulaiman, and M. M. Noordin, “Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: a comparative in vivo study,” *Human & Experimental Toxicology*, vol. 23, no. 11, pp. 519–525, 2004.
 - [18] R. J. Rodriguez and D. Acosta Jr., “N-Deacetyl ketoconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of rat hepatocytes,” *Toxicology*, vol. 117, no. 2-3, pp. 123–131, 1997.
 - [19] R. J. Rodriguez, P. J. Proteau, B. L. Marquez et al., “Flavin-containing monooxygenase-mediated metabolism of N-deacetyl ketoconazole by rat hepatic microsomes,” *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 27, no. 8, pp. 880–886, 1999.
 - [20] L. H. Lash, D. A. Putt, S. E. Hueni, R. J. Krause, and A. A. Elfarrar, “Roles of necrosis, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine sulfoxide-induced cytotoxicity in primary cultures of human renal proximal tubular cells,” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 305, no. 3, pp. 1163–1172, 2003.
 - [21] M. Maes, T. Vanhaecke, B. Cogliati et al., “Measurement of apoptotic and necrotic cell death in primary hepatocyte cultures,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1250, pp. 349–361, 2015.
 - [22] D. D. F. Á. Alcântara, H. F. Ribeiro, P. C. D. S. Cardoso et al., “In vitro evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of artemether, an antimalarial drug, in a gastric cancer cell line (PG100),” *Journal of Applied Toxicology*, vol. 33, no. 2, pp. 151–156, 2013.
 - [23] R. Chen, W. Lee, Y. Liang et al., “Ketoconazole Induces G0/G1 Arrest in Human Colorectal and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 169, no. 2, pp. 132–141, 2000.
 - [24] Q. Hu, Y. Hou, J. Huang, J. Fang, and H. Xiong, “Itraconazole induces apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting Hedgehog signaling in gastric cancer cells,” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 36, no. 1, 2017.
 - [25] D. Markovic, J. Katic, R. Stojkovic, S. Borovic, N. Zarkovic, and A. Fucic, “Lipid peroxidation, detoxification capacity, and genome damage in mice after transplacental exposure to pharmaceutical drugs,” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 46, no. 12, pp. 1014–1020, 2013.
 - [26] A. Fucic, D. Markovic, Z. Herceg et al., “Developmental and transplacental genotoxicology: Fluconazole,” *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 657, no. 1, pp. 43–47, 2008.
 - [27] C. D. Mahl, C. S. Behling, F. S. Hackenhaar et al., “Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: Activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage,” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 82, no. 3, pp. 203–208, 2015.
 - [28] W. Lee and D. G. Lee, “A novel mechanism of fluconazole: fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans*,” *Microbiology*, vol. 164, no. 2, pp. 194–204, 2018.
 - [29] S. Periasamy, C. Liu, S. Chien, Y. Chen, and M. Liu, “Daily sesame oil supplementation mitigates ketoconazole-induced oxidative stress-mediated apoptosis and hepatic injury,” *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 37, pp. 67–75, 2016.
 - [30] H. Sozen, O. I. Celik, E. S. Cetin et al., “Evaluation of the Protective Effect of Silibinin in Rats with Liver Damage Caused by Itraconazole,” *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 71, no. 2, pp. 1215–1223, 2014.
 - [31] L. J. Marnett, “Oxyradicals and DNA damage,” *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 3, pp. 361–370, 2000.
 - [32] M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, and J. Lunec, “Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease,” *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 10, pp. 1195–1214, 2003.
 - [33] A. R. Collins, “Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1840, no. 2, pp. 794–800, 2014.
 - [34] W. Zong and C. B. Thompson, “Necrotic death as a cell fate,” *Genes & Development*, vol. 20, no. 1, pp. 1–15, 2006.
 - [35] K. Sinha, J. Das, P. B. Pal, and P. C. Sil, “Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis,” *Archives of Toxicology*, vol. 87, no. 7, pp. 1157–1180, 2013.
 - [36] R. Van der Pas, L. J. Hofland, J. Hofland et al., “Fluconazole inhibits human adrenocortical steroidogenesis in vitro,” *Journal of Endocrinology*, vol. 215, no. 3, pp. 403–412, 2012.

