

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Atividade tóxica e genotóxica induzida por combinações de antirretrovirais em *Drosophila melanogaster* e camundongos *Mus musculus*

> Goiânia 2016





TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: [] Dissertação [X] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Aroldo Vieira de Moraes Filho

Título do trabalho: Atividade tóxica e genotóxica induzida por combinações de antirretrovirais em *Drosophila melanogaster* e camundongos *Mus musculus*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [] SIM [X] NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 23 / 11 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.





TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Golás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: [] Dissertação [X] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Thorse Duina de Marses Like

constructions ag abycubnic assidence a asside ababiret contactor of allert ab alut

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO1

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do (a) autor (a) 2

Data: 06/06/2022

²A assinatura deve ser escanenda

I Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o periodo de embargo.

AROLDO VIEIRA DE MORAES FILHO

Atividade tóxica e genotóxica induzida por combinações de antirretrovirais em *Drosophila melanogaster* e camundongos *Mus musculus*

Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica e Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lee Chen Chen

Goiânia 2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EMCIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 50

ï

2 Aos sete días do mês de novembro do ano de dois mil e dezesseis, às catorze horas, na Sala 205 do Instituto de Química da Universidade Federal de Golás, 3 4 reuniram-se os componentes da banca examinadora: Profa. Dra. Lee Chen 3 Chen, Profa. Dra. Débora de Jesus Pires, Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais, Prof. Dr. Mário Antônio Spanó e Profa. Dra. Carolina Ribeiro e 6 Silva para, em sessão pública presidida pela primeira examinadora citada, 7 procederem à avallação da defesa de tese intitulada "Atividade tóxica e 8 genotóxica induzida por combinações de antimetrovirais em Drosophila -9 10 melanogaster e camundongos Mus musculus", em nível de Doutorado, área de concentração em Bioquímica e Genética, de autoria de Aroldo Vieira de 11 12 Moraes Filho, discente do Programa de Pós-Graduação em Clências Biológicas da Universidade Federal de Golás. A sessão foi aberta pela 13 presidenta, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, 14 a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em cerca de 40 15 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a 16 apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado 17 o sistema de diálogo seguencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à 18 avaliação da tese. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1340 de 19 2015 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que 20 regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a tese foi 21 A provide considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins 22 de obtenção do título de Doutor em Clências Biológicas pela Universidade 23 Federal de Golás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão 34 25definitiva da tese na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da 26 27 defesa.Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 45 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Renato 28



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOLÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS IOGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EMCIÊNCIAS BIOLÓGICAS

 do Instituto de Clências Biológicas da Universidade Federal de Golás, lavrel a presente ata que, após lide e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor. <i>I</i> <i>I</i><th>29</th><th>César Rodrigues, Assistente em Administração da Secretaria de Pós-graduação</th>	29	César Rodrigues, Assistente em Administração da Secretaria de Pós-graduação
11 presente ata que, após lide e aprovada, será assinada pelos membros da 12 banca examinadora em três vias de igual teor. 13 Image: Second Secon	30	do Instituto de Clências Biológicas da Universidade Federal de Golás, lavrei a
 banca examinadora em três vias de igual teor. <i>E</i> <i>E</i> <i>Profa.</i> Dra. Les Chen Chen <i>Universidade</i> Federal de Goiás <i>Profa.</i> Dra. Les Chen Chen <i>Profa.</i> Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóla-Morais <i>Profa.</i> Dra. Débora de Jesús Pires <i>Prof.</i> Dr. Mario Antônio Spanó Universidade Federal de Uberlândia <i>Profa.</i> Dra. Carolina Ribeiro e Silva <i>Universidade</i> Federal de Goiás 	31	presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da
33 34 35 36 37 38 39 39 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 30 31 32 43 44 45 46 47 48 49 49 49 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 49 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 40 10 10	32	banca examinadora em três vias de igual teor.
34 Z.G. 36 Profa. Dra. Lee Chen Chen 37 Universidade Federal de Goiás 38 Presidenta da Banca 39 Jumme Hat. de Salura Horais 40 Jumme Hat. de Salura Horais 41 Profa. Dra. Simone Maria Telxeira de Sabóla-Morais 42 Universidade Federal de Goiás 43 Jumersidade Federal de Goiás 44 Jumersidade Federal de Goiás 45 Jora Dra. Débora de Jesús Pires 46 Universidade Estadual de Goiás 47 Profa. Dr. Mario Antônio Spanó 48 Jumiersidade Federal de Ubertândia 49 Profa. Dr. Mario Antônio Spanó 49 Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva 41 Jumiersidade Federal de Goiás	33	
36 Image: State Stat	34	
36 Profa. Dra. Lee Chen Chen 37 Universidade Federal de Goiás 38 Presidenta da Banca 39 Jumme Mart. de Sachima Komis 40 Jumme Mart. de Sachima Komis 41 Profa. Dra. Simone Maria Telxeira de Sabóla-Morais 42 Universidade Federal de Goiás 43 Juniversidade Federal de Goiás 44 Juniversidade Estadual de Goiás 45 Profa. Dra. Débora de Jesús Pires 46 Universidade Estadual de Goiás 47 Juniversidade Federal de Uberlândia 48 Profa. Dr. Mario Antônio Spanó 49 Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva 49 Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva 41 Universidade Federal de Goiás	35	267
17 Universidade Federal de Goiás 18 Presidenta da Banca 19 Jumme Hatt & Salada Korais 10 Jumme Hatt & Salada Korais 11 Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóla-Morais 12 Universidade Federal de Goiás 13 Juliversidade Federal de Goiás 14 Juliversidade Federal de Goiás 15 Juliversidade Estadual de Goiás 16 Universidade Estadual de Goiás 17 Juliversidade Federal de Uberlândia 18 Juliversidade Federal de Uberlândia 19 Juliversidade Federal de Uberlândia 19 Juliversidade Federal de Uberlândia 10 Juliversidade Federal de Goiás 13 Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva 14 Universidade Federal de Goiás	36	Profa. Dra. Lee Chen Chen
Image: Second	37	Universidade Federal de Goiás
39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 49 49 49 49 49 49 49 49 49 49 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 49 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 40 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 10 11	38	Presidenta da Banca
40 Summe Mart. de Salusia - Korais 41 Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóla-Morais 42 Universidade Federal de Golás 43 Jahr M. de Jahr 44 Jahr M. de Jahr 45 Jahr M. de Jahr 46 Jahr M. de Jahr 47 Profa. Dra. Débora de Jesús Pires 48 Universidade Estadual de Golás 49 Prof. Dr. Mario Antônio Spanó 90 Universidade Federal de Ubertândia 51 Jahr M. de Jahr 52 Jahr M. de Jahr 53 Prof. Dr. Mario Antônio Spanó 54 Universidade Federal de Ubertândia 51 Jahr 52 Jahr 53 Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva 54 Universidade Federal de Golás	39	
 41 Profa. Dra. Simone Maria Telxeira de Sabóla-Morais 42 Universidade Federal de Golás 44 44 45 Profa. Dra. Débora de Jesús Pires 46 47 48 49 Prof. Dr. Mario Antônio Spanó 49 Universidade Federal de Uberlândia 51 51 52 Junt de La d	40	Servere HAT. de Salisia- Mornis.
 42 43 44 45 46 47 48 49 49 49 49 49 49 49 49 40 40 41 41 42 43 44 45 46 47 48 49 49 40 40 41 41 42 43 44 45 46 47 47 48 49 49 40 41 41 42 43 44 44 45 46 47 47 48 49 49 40 40 41 41 42 43 44 44 44 45 46 47 48 49 49 49 40 40 41 41 42 43 44 <	41	Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóla-Morais
 43 44 45 46 47 48 49 40 41 41 42 43 44 45 46 47 48 49 49 40 41 41 42 43 44 45 46 47 47 48 49 49 40 41 41 42 43 44 44 45 46 47 47 47 48 49 49 40 41 41 42 43 44 44 44 44 44 44 44 44 45 46 47 47 47 47 47 47 48 49 49 49 40 40 41 41 42 44 <	42	Universidade Federal de Goiás
 44 45 46 47 48 49 40 41 41 42 43 44 44 45 46 47 48 49 49 40 41 41 42 43 44 44 45 46 47 47 48 49 40 41 41 42 43 44 44 44 45 46 47 <	43	~ 111
 43 44 45 46 47 48 49 49 49 49 40 40 41 41 42 43 44 44 45 46 47 48 48 49 49 40 40 41 42 43 44 44 45 46 47 47 48 49 49 40 40 41 42 43 44 44 44 45 46 47 <	44) et m ck/ ha
 46 47 48 49 40 40 41 41 42 43 44 44 44 45 46 47 47 47 47 46 47 47 46 47 46 47 46 47 47 47 47 47 46 47 47 46 47 <	45	Profa. Dra. Débora de Jesús Pires
 47 48 49 49 49 49 49 49 40 40 41 41 42 42 43 44 <	46	Universidade Estadual de Goiás
 48 49 49 49 40 40 40 40 40 40 41 41 41 42 42 43 44 <	47	
49 Prof. Dr. Mario Antônio Spanó 50 Universidade Federal de Uberlândia 51 Image: State of the state o	48	alin
50 Universidade Federal de Uberlândia 51 51 52 Juniformation de Carolina Ribeiro e Silva 53 Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva 54 Universidade Federal de Goiás	49	Prof. Dr. Mario Antônio Spanó
51 53 53 Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva 54 Universidade Federal de Goiás	50	Universidade Federal de Uberlândia
51 Implemente 53 Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva 54 Universidade Federal de Goiás	51	
53 Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva 54 Universidade Federal de Goiás	53	1 Pandalumentika
54 Universidade Federal de Goiás	53	Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva
	54	Universidade Federal de Goiás

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS FOLHA DE APROVAÇÃO

AROLDO VIEIRA DE MORAES FILHO

Atividade tóxica e genotóxica induzida por combinações de antirretrovirais em Drosophila melanogaster e camundongos Mus musculus

Tese apresentada em 07 de novembro de 2016, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas - área de concentração: Bioquímica e Genética, perante a Banca Examinadora constituída pelos membros:

..... Prof. Dr. Mário Antônio Spanó Membro Titular – UFU

.....

Profa. Dra. Débora de Jesus Pires Membro Titular - UEG/Morrinhos

..... Profa. Dra. Simone M^a. T. de Sabóia-Morais Membro Titular – ICB/UFG

Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva Membro Titular - ICB/UFG

..... Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva

Membro Suplente – ICB/UFG

.....

Profa. Dra. Nilza Nascimento Guimarães Membro Suplente – ICB/UFG

Profa. Dra. Lee Chen Chen Orientadora/Presidente da banca - ICB/UFG

Avaliação: () Aprovado

() Reprovado

Goiânia, Goiás Brasil

Dedico esta tese à minha mãe, Leliane Viégas, à minha irmã, Ana Lara Viégas, e à minha "mãe científica" Profa. Dra. Kênya Silva Cunha.

Vocês foram essenciais para a concretização desse sonho, seja me apoiando constantemente ou ainda servindo de exemplo que a luta é diária, mas não devemos desistir nunca para alcançarmos o sucesso. Mulheres guerreiras que, com seus jeitos singulares e especiais, me inspiram sempre. Obrigado por existirem na minha vida!

"Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade." (Raul Seixas)

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar vivo e ter alegria em minha vida! Agradeço ao Bom Deus por todas as bênçãos recebidas, mostrando que sou protegido, guiado e iluminado. Tenho tido muito mais do que pedi ou esperava ter. Deus, em sua infinita misericórdia, deu e continua me dando a oportunidade de realização de sonhos, como esse doutorado, sempre com paz, alegria, saúde, amor, coragem e todas as forças necessárias para a concretização dos meus sonhos.

À melhor mãe do mundo, Leliane Viégas Muniz, por não ter apenas me dado a vida, mas além disso, me ajudar a construir a pessoa que sou hoje. Sempre presente, educando, cuidando, mimando, repreendendo, me indicando os melhores caminhos e quando eu sentia insegurança achando que não poderia ir sozinho, a senhora me levava até eles. Sou um filho afortunado, sempre dormi no conforto da sua proteção e carinho e meus sonhos sempre foram alimentados pelo seu apoio. Eu queria que existissem mais e melhores palavras para que pudesse com justiça lhe agradecer e prestar a devida homenagem, mas quero que sinta no coração todo amor, orgulho e admiração que sinto pela senhora. Obrigado por todos os momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos conselhos, pelo amor, pela honestidade, pela amizade, pelo coração de tamanho e generosidade infinitas e por fazer as coisas, exatamente como a senhora faz, por amor e não por reconhecimento. Meu coração é inundado por gratidão à senhora. Eu nunca deixarei de amá-la, minha vida!

À minha irmã, Ana Lara Viégas Serbeto, por ser o meu melhor presente e a minha força diária. Você sempre acreditou em mim, desde bebê, você nunca pensou assim: "Se um dia meu irmão for doutor...", sua frase sempre foi: "Quando meu irmão for doutor...", ou seja, você sempre profetizou coisas boas para a minha vida e, hoje, nosso sonho se realiza. Sinto que nossa ligação é ímpar e incondicional. Somos mais que sangue, somos sentimento verdadeiro, cumplicidade, atenção e cuidado. Tenho orgulho em ser seu irmão. Desejo que a felicidade caminhe sempre ao seu lado e que o amor que nos tem unido jamais tenha fim, minha princesa!

À minha família, por sempre me apoiarem. Vocês são muito especiais para mim. Agradeço sempre pela família que tenho, porque cada um com sua peculiaridade me faz sempre amar vocês. Espero que nosso amor nunca acabe, que nossa fraternidade seja eterna e que nossos encontros sejam constantes. Amo cada um de vocês! À Profa. Dra. Kênya Silva Cunha, pela sua disponibilidade, durante todo o trabalho e incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir esse doutorado. Por motivos de força maior, teve a aposentadoria adiantada, mas nunca me abandonou durante o doutorado. Gostaria de destacar a forma interessada, pertinente, extraordinária e competente como acompanhou a realização deste trabalho. Agradeço por compartilhar comigo os seus conhecimentos, pois as críticas construtivas, as discussões e reflexões me ensinaram muito. Minha "mãe-científica" que, com a convivência, contribuiu muito para o meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço pela amizade, cumplicidade, orientação, parceria e pela oportunidade de trabalhar com uma profissional tão competente e que admiro tanto como a senhora!

À Profa. Dra. Lee Chen Chen, que tão prontamente e docemente me acolheu em seu laboratório e prosseguiu a minha orientação de doutorado, permitindo que esse sonho se concretizasse. Agradeço pela orientação, pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento dessa tese e por compartilhar comigo os seus conhecimentos. A convivência com a senhora, me tornou uma pessoa melhor, pois a senhora sempre leva a vida com um astral extraordinário e tem uma forma singular de resolver os problemas. Serei eternamente grato e admirador do seu trabalho e da sua pessoa. Muito obrigado!

À Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva que sempre se mostrou disposta a me ajudar em todos os momentos que precisei durante o doutorado. Obrigado pela convivência e pelos ensinamentos que muito contribuíram para a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Rohde que me acolheu em seu laboratório na Universidade Federal de Pernambuco e me ensinou o teste Cometa com *Drosophila melanogaster*. Agradeço pela contribuição, amizade e por compartilhar comigo seus conhecimentos. Estendo meus agradecimentos a todos os membros da sua equipe, em especial, ao amigo que fiz e quero levar para a vida toda Prof. Me. Cícero Jorge Verçosa, que me acompanhou durante o teste. Agradeço pela amizade, companheirismo e disponibilidade que sempre demonstrou muito entusiasmo ao me auxiliar com o teste.

Aos professores da banca de qualificação, pelas pertinentes contribuições que auxiliaram a confecção final deste trabalho.

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora, primeiramente por aceitarem o convite e adicionalmente pelos imprescindíveis apontamentos para o enriquecimento do trabalho e, consequentemente, do meu aprendizado. Aos meus companheiros e amigos do Laboratório de Radiobilogia e Mutagênese, Cláudia Carvalho, Camila Vale, Cristiene Carneiro, Débora Silva e Rangel Moreira que tornaram essa caminhada mais prazerosa. Agradeço pela amizade, pelas conversas, conselhos, colaboração, incentivo, pelo esforço e auxílios essenciais para realização deste trabalho.

À Farmácia Ambulatorial do Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad, especialmente em nome da farmacêutica Ma. Janaína Bacellar Acioli Lins e da auxiliar de farmácia Sandra Maria Pires de Mendonça, pela presteza ao ceder as amostras dos antirretrovirais que foram testados neste trabalho.

Aos meus amigos, por alegrarem meus dias, me dando apoio para persistir em busca dos meus sonhos e objetivos.

Aos professores, colegas e técnicos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas com os quais tive a honra de poder compartilhar de seus conhecimentos, seja durante as disciplinas que cursei ou mesmo nas conversas pelos corredores da Universidade Federal de Goiás.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa que me auxiliou financeiramente para realização da pesquisa.

Enfim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que de certa forma tiveram influência direta ou indireta, incentivando-me e torcendo para perseverar em busca dos meus sonhos.

"Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor." (Johann Goethe)

RESUMO

Em decorrência das diversas mutações do HIV e consequentes falhas nos tratamentos com apenas um fármaco, tornou-se fundamental o emprego de combinações de dois ou mais medicamentos antirretrovirais em protocolos de tratamento da AIDS. Diante disso, as investigações realizadas neste trabalho concentraram-se na avaliação dos efeitos relacionados com a citotoxicidade e a genotoxicidade dos medicamentos Efavirenz (EFV) e Tenofovir (TDF) como medicamentos isolados e em combinação com Combivir[®] (AZT+3TC) e Lamivudina (3TC). Para isso, foram utilizados três sistemasteste: (i) Ensaio Cometa em Drosophila e medula óssea de camundongos, visando a determinação da ação genotóxica dos medicamentos testados por meio de quebras na fita de DNA; (ii) Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em Drosohpila melanogaster, que avalia a atividade tóxica, mutagênica e recombinogênica dos compostos e (iii) Teste de Micronúcleo (MN) em medula óssea de camundongos que detecta o efeito aneugênico e clastogênico dos agentes. Os resultados demonstraram que o EFV foi tóxico nas maiores concentrações testadas e não apresentou indução de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos. Inversamente, Combivir e Combivir+EFV não atingiram dose letal 70 (DL 70) nas concentrações utilizadas para análise genotóxica, porém induziram efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos em todas as concentrações testadas, com prevalência de eventos recombinogênicos. Os antirretrovirais TDF, 3TC e TDF+3TC também não foram tóxicos, mas foram genotóxicos em todas as concentrações testadas, com prevalência de recombinogenicidade. Todos os compostos isolados e combinados apresentaram resultados positivos no Ensaio Cometa com Drosophila melanogaster. No entanto, as combinações Combivir+EFV e TDF+3TC foram negativos no Ensaio Cometa com medula óssea de camundongos. Combivir+EFV induziu MN em 24 e 48h. TDF+3TC induziu MN apenas no tratamento de 24h. Com base nesses resultados, espera-se ampliar o conhecimento a respeito da atividade tóxica e genotóxica dessas combinações e servir de apoio para o desenvolvimento de novos estudos nos protocolos de tratamento da AIDS.

Palavras-chave: recombinação, mutagênese, clastogênese, aneugênese, terapia antirretroviral altamente ativa (HAART).

ABSTRACT

As result of several mutations of HIV and failures resulting in treatments with only one medicine, it became critical to use a combination of two or more antiretrovirals in AIDS treatment protocols. So, the investigations that were carried out in this research were concentrated in the evaluation of the effects related with cytotoxicity and genotoxicity of Efavirenz (EFV) e Tenofovir (TDF) as isolated and in combination with Combivir® (AZT+3TC) and Lamivudina (3TC). For this, three test systems were used: (i) the Comet assay in Drosophila and mouse bone marrow in order to determine the genotoxic effects of the drugs tested by the DNA strand breaks; (ii) the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in Drosophila melanogaster, that evaluates the toxic, mutagenic and recombiningenic activity of the compounds and (iii) the Micronucleus Test (MN) in mouse bone marrow, that detects aneugenic and clastogenic effects of agents. The results demonstrated that EFV was toxic at high concentrations and did not show induction of mutagenic and/or recombinogenic events. Inversely, Combivir and Combivir+EFV showed no lethal dose 70 (LD 70) in the concentrations used for genotoxic analysis, but induced mutagenic and/or recombinogenic effects in all tested concentrations, with prevalence of recombinogenic events. The antiretrovirals TDF, 3TC and TDF + 3TC were not toxic, but were gentoxic in all tested concentrations, with a prevalence of recombinogenicity. All of the isolated and combined compounds were positive in the Comet-assay with D. melanogaster. However, the two combinations were negative in the Comet-assay with mouse bone marrow. Combivir+EFV induced micronuclei (MN) in 24 and 48 hours. TDF+3TC induced MN only in 24 hours. Based on these results, we expect to expand the knowledge about the toxic and genotoxic activities of these combinations and to provide support for the development of new studies in AIDS treatment protocols.

Keywords: recombination, mutagenesis, clastogenicity, aneugenicity, Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART).

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO	12
1. Medicamentos antirretrovirais	12
2. Terapia antirretroviral altamente ativa (HAART)	16
3. Organismos modelo: Drosophila melanogaster e Mus musculus	17
4. Genética toxicológica e testes utilizados	19
5. Objetivos	22
CAPÍTULO 2	
MATERIAL E MÉTODOS	23
1. Agentes antirretrovirais	23
2. Testes com Drosophila melanogaster	24
2.1. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART)	24
2.1.1 Linhagens teste de Drosophila melanogaster	25
2.1.2 Procedimento experimental e tipos de larvas	25
2.1.3 Montagem e análise microscópica das lâminas	26
2.1.4 Bases genéticas e classificação dos clones	27
2.1.5 Análise estatística	27
2.1.6 Cálculo do Índice de Combinação (IC)	28
2.2. Ensaio Cometa com Drosophila melanogaster	28
2.2.1 Linhagem teste	28
2.2.2 Extração da hemolinfa	28
2.2.3 Preparo das lâminas e eletroforese	29
2.2.4 Análise microscópica	30
2.2.5 Análise estatística	31
2.2.6 Cálculo do Índice de Combinação	31
3. Testes com camundongos Mus musculus	32
3.1 Ensaio Cometa com medula óssea	33
3.2 Teste do Micronúcleo	34

CAPÍTULO 3

In vivo Genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) alone and in combinations 36

Comprovante de submissão do artigo à revista Toxicology and Applied	
Pharmacology (Fator de Impacto: 3.847)	71
CAPÍTULO 4	
Genotoxic and cytotoxic effects of antiretroviral combinations in mice	
bone marrow	72
Comprovante de aceite do artigo - Revista Plos One (Fator de Impacto:	100
3.54)	
CAPÍTULO 5	
DISCUSSÃO	101
CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	109

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. Medicamentos antirretrovirais

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que acomete o sistema imunológico. Esse vírus ataca os linfócitos T CD4⁺, facilitando o contágio de "doenças oportunistas", que variam desde resfriados até infecções mais graves (Ministério da Saúde, 2015a).

Segundo o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), no mundo, aproximadamente 34 milhões de pessoas vivem com HIV. No Brasil, desde a detecção da doença em 1980 até junho de 2012 foram registrados 656.701 casos de AIDS, de acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde. Em 2011, foram notificados 38.776 casos e a taxa de incidência de AIDS no Brasil foi de 20,2 casos por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2016a; Ministério da Saúde, 2016b, UNAIDS, 2016).

Em 1982, dois anos após a identificação da AIDS como doença, iniciou-se uma busca intensa por compostos que inibissem a infectividade e replicação do vírus. Portanto, pesquisas científicas focaram nas etapas do ciclo de replicação do vírus para servirem como alvos para intervenção farmacológica no intuito de inibir essas etapas e, por conseguinte, tornarem-se eficazes no tratamento da doença (Peçanha et al., 2002; DeClercq, 2009; Tintori et al., 2014).

A partir desses estudos, surgiram os medicamentos antirretrovirais usados para impedir a multiplicação do vírus no organismo, reduzindo assim, a virulência do HIV sem eliminá-lo das células infectadas. Então, o uso desses medicamentos tornou-se fundamental para aumentar o tempo e a qualidade de vida dos portadores de AIDS, por evitarem o enfraquecimento do sistema imunológico e, consequentemente, reduzirem os riscos de serem acometidos por "doenças oportunistas" (Ministério da Saúde, 2016c).

Portanto, de acordo com o alvo de sua interação no ciclo replicativo do HIV, os medicamentos antirretrovirais são divididos em diferentes categorias. Essas categorias são: (i) os inibidores de proteases (IPs) que atuam nessa enzima, bloqueando a sua ação e impedindo a produção de novas cópias de células infectadas com HIV; (ii) inibidores de fusão (FIs) que impedem a entrada e, consequentemente, a reprodução do vírus na célula; (iii) inibidores de correceptores (CRIs) que interagem com os receptores CCR5 ou CXCR4, impedindo a entrada do vírus nas células; (iv) inibidores de integrase, que

bloqueiam a atividade dessa enzima, responsável pela inserção do DNA do HIV no genoma humano; (v) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (NRTIs); (vi) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (NRTIs); (vii) inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (NNRTIs). As drogas pertencentes às categorias NRTIs e NtRTIs interagem com o sítio catalítico da enzima transcriptase reversa (TR), enquanto as NNRTIs interagem com sítios alostéricos da enzima. A TR é a enzima responsável pela conversão do RNA viral em DNA, antes que o material genético do vírus se integre ao genoma da célula infectada (De Clercq, 2009).

No final de 2012, cerca de 9,7 milhões de pessoas no mundo tiveram acesso à terapia antirretroviral (UNAIDS, 2016b). Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil, cerca de 313 mil pessoas recebem regularmente os remédios para tratar a doença. Desde 1996, o país distribui gratuitamente o coquetel anti-AIDS para todos que necessitam do tratamento (Ministério da Saúde, 2016c).

O primeiro composto que demonstrou capacidade de inibir a replicação do HIV tanto *in vitro* quanto *in vivo* foi a suramina, mas o primeiro agente anti-HIV a ser licenciado para uso clínico, em 1987, foi a zidovudina (3'-azido-3'-desoxitimidina; AZT). Esse antirretroviral pertence a classe dos NRTIs e sua metabolização no fígado ocorre por enzimas da via UDP-glicoronosiltransferase (UGT), excretando seu metabólito 5'-O-glicuronídeo na urina (Cretton et al., 2007; De Clercq, 2009).

Quando administrado por via oral, a solução de AZT nas doses de 2 a 10 mg/kg apresentou uma biodisponibilidade de aproximadamente 65% (Cload, 1989). Após sua entrada na célula, o AZT é fosforilado à sua forma ativa AZT-5'-trifosfato, que agirá como inibidor competitivo ou substrato alternativo da TR ao invés do desoxinucleosídeo trifosfato endógeno (dNTP). Por ser análogo da timidina-5'trifosfato, o AZT competirá como o dTTP e agirá como terminador da cadeia de DNA (Barbier et al., 2000; DeClercq, 2009).

Outro NRTI muito utilizado no tratamento da AIDS é a lamivudina (3TC), também denominada de enantiômero negativo da 2'-desoxi-3'-tiacitidina. Sua fosforilação em 3TC monofosfato é catalisada pela enzima desoxicitidina quinase. Em seguida sua conversão da forma monofosfato em difosfato é realizada pelas enzimas citidina monofosfato quinase e desoxicitidina monofosfato quinase. Seu metabólito ativo (3TC-5'-trifosfato) é convertido pela enzima pirimidina nucleosídeo difosfato quinase que, por ser análogo da citidina, competirá com dCTP e será incorporado ao DNA viral, ocasionando o término do elongamento da cadeia. Quando administrado por via oral, sua disponibilidade média absoluta variou entre 86 a 88% para solução oral, cápsula e comprimido (Yuen et al., 1995; Johanson et al., 1999; DeClercq, 2009).

Pertencente a classe NNRTIs dos antirretrovirais, o efavirenz (EFV) ou (4S)-6cloro-4-(ciclopropiletinil)-1, 4-dihidro-4-(trifluorometil) 2-H-3, 1-benzoxazina 2-1 (Raju e Begon, 2008), destaca-se por ser um dos componentes preferidos do regime de primeira linha no tratamento de infecção pelo HIV em todo o mundo, além de ser a primeira geração de NNRTIs. Levando em consideração o aumento do acesso a terapia antirretroviral, a potencial exposição da população mundial ao EFV é muito grande (Rakhmanina e Anker, 2010). Diferentemente dos NRTIs, seu mecanismo de ação consiste na inibição alostérica da TR, por meio da ligação a um local diferente do sítio ativo dessa enzima, com a finalidade de alterar a sua configuração e, consequentemente, anular a sua capacidade catalítica. São moléculas não competitivas em relação a desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) e, portanto, não tem qualquer efeito direto sobre o ácido nucleico de ligação à TR (Iyidogan e Anderson, 2012).

O EFV é metabolizado principalmente por via hepática pelo citocromo P450, isoenzima CYP2B6. O gene CYP2B6 foi mapeado no cromossomo 19 e apresenta polimorfismos que codificam para a enzima, podendo, portanto, influenciar no metabolismo do fármaco. Como no caso da variante alélica 516G>T que está associada com uma menor atividade da isoenzima CYP2B6 e consequente aumento da concentração plasmática do EFV, causando maior incidência de toxicidade neuropsicológica associada ao fármaco. Ainda na metabolização do EFV, há o envolvimento parcial de CYP3A4 e CYP2A6 para metabólitos hidroxilados inativos que incluem 8-hidroxiefavirenz e 7-hidroxiefavirenz. O 8-hidroxiefavirenz é o principal metabólito do EFV in vitro e in vivo, e a contribuição de 7-hidroxilação à depuração total de EFV é considerada pequena. Estudos recentes sugerem que o CYP2A6 é o principal responsável pela 7-hidroxilação e catalisa a segunda etapa de hidroxilação do 8-hidroximetabólito para 8,14-dihidroxiefavirenz. Estima-se que aproximadamente 17% de 8-hidroxiefavirenz é ainda oxidado a 8,14-dihidroxiefavirenz in vitro. Os metabólitos hidroxilados de EFV sofrem excreção biliar e urinária subsequente após conjugação (Ogburn et al., 2010; Gounden et al., 2010). Essa droga quando administrada por via oral apresenta uma disponibilidade variável entre 40 e 45% (Chiappetta et al., 2015).

Também muito utilizado nas terapias antirretrovirais, fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) ou 9-((R)-2-((Bis (((isopropoxicarbonil)oxi) metoxi) fosfonil) metoxi) propil) adenina fumarato que é o pró-fármaco oral de tenofovir, com atividade

antiviral contra o vírus da hepatite B (HBV) e o HIV (Raju e Begon, 2008). O TDF é um NtRTI, análogo da 5'-monofosfato de adenosina, que não apresenta uma hidroxila no carbono 3 da desoxirribose. Portanto, uma incorporação de TDF no elongamento do DNA viral interrompe a sequência da transcrição, impedindo a ligação do próximo nucleotídeo (Johnson et al., 2010). Essa classe de antirretrovirais é constituída por prófármacos que necessitam de ativação metabólica por meio de vias de fosforilação que produzem os seus derivados difosfato e trifosfato, respectivamente. Estes derivados servem como substratos alternativos para a síntese do DNA viral catalisada pela TR do HIV-1. Esses análogos competem com os substratos naturais, os desoxiribonucleosídeos trifosfatos (dNTP) e interrompem a formação da cadeia de DNA viral após a sua incorporação (Iyidogan e Anderson, 2012).

O TDF possui um perfil de citotoxicidade favorável, por ser um inibidor muito fraco das DNA polimerases α e β em mamíferos e DNA polimerase mitocondrial γ (Lee et al., 2003; DeClercq e Holly, 2005; Delaney et al., 2006). Quando administrado por via oral, sua biodisponibilidade é de aproximadamente 25% (Gallant e Deresinski, 2003).

No entanto, em alguns estudos com estes fármacos isolados foram relatados vários efeitos colaterais relacionados com genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. O TDF e o EFV foram capazes de induzir adenomas e carcinomas hepatocelulares e adenomas pulmonares alveolar/bronquiolar em camundongos fêmeas. A AZT mostrou efeitos clastogênicos, danos ao DNA nuclear e mitocondrial, troca de cromátides irmãs e redução dos telômeros. O 3TC mostrou efeitos clastogênicos com indução de micronúcleos (Gonzales Cid e Larripa, 1994; Schilling et al., 1995; BialKowska et al., 2000; Bishop et al., 2004; Von Tungeln et al., 2004; Ji et al., 2005; Carter et al., 2007; Bayram e Topaktas, 2008; Olivero et al., 2008; Desai et al., 2009; Lourenço et al., 2010; Butt et al., 2011; Friedrich e Olejniczak, 2011; Wu et al., 2012; André-Schmutz et al., 2013; Olivero et al., 2013; Chiappini et al., 2014; Miller et al., 2014, Kaushik et al., 2014).

Porém, em decorrência das diversas mutações do HIV e consequentes falhas nos tratamentos com apenas um fármaco, tornou-se fundamental a necessidade de combinar dois ou mais medicamentos antirretrovirais para a realização de protocolos de tratamento da AIDS (Bossi et al., 1998; Duan et al., 2001; Re et al., 2003; Turner et al., 2004; Parikh et al., 2006; Entheshami et al., 2008; Walker et al., 2009). Somado ao fato de que nos últimos anos houve pouco progresso em relação ao desenvolvimento da

vacina contra o HIV, obtendo-se eficácia máxima de 31,2% (Rerks-Ngarm et al., 2009). Portanto, a terapia de combinação de drogas para combater a infecção por HIV, surge como um avanço promissor no tratamento da AIDS. Entretanto, essa terapia é limitada pelo seu custo, pela exigência de adesão ao longo da vida e pelos efeitos desconhecidos ao longo do tratamento (Rerks-Ngarm et al., 2009; Richman et al., 2009).

2. Terapia antirretroviral altamente ativa (HAART)

As terapias que combinam dois ou mais medicamentos pertencentes à mesma classe ou a diferentes classes de antirretrovirais, também conhecidas como terapia antirretroviral altamente ativa (HAART, do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*), favoreceram o tratamento da AIDS que, devido ao sucesso da supressão viral, da reconstituição imunológica do hospedeiro e, consequentemente, da prevenção de doenças oportunistas, fez com que essa doença passasse a ser considerada como uma doença crônica controlável, melhorando a qualidade e aumentando a expectativa de vida dos pacientes (Hawkins, 2010).

No entanto, apesar da HAART ser utilizada desde 1990, faz-se necessários estudos que visem correlacionar eficácia e efeitos colaterais no intuito de oferecer protocolos alternativos que combatam a virulência, mas que diminuam a toxicidade e a resistência viral ao tratamento (Brown et al., 2009; DeClercq, 2009).

Comumente, diretrizes para o tratamento da infecção por HIV, por meio da utilização da HAART, incluem as combinações de medicamentos: TDF+3TC e EFV+Combivir (AZT+3TC) (Gallant et al , 2006; Pozniak et al , 2006; Herd et al., 2014; *Guidelines...*, 2015). Todavia, estas combinações podem potencializar os efeitos genotóxicos induzidos por essas drogas isoladas, uma vez que seus efeitos secundários são desconhecidos durante o tratamento (Guimarães, 2013; Guimarães et al., 2013).

Por isso, tem-se analisado vários antirretrovirais que demonstraram ou não a indução de recombinação mitótica, utilizando o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART). Em estudo realizado em nosso laboratório foi demonstrado que, no total de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos, a zidovudina (AZT) apresentou 85% de eventos recombinacionais, enquanto a didanosina (ddI) foi 100% recombinogênica (Guimarães et al. 2008). Em outro estudo do nosso grupo, desenvolvido por Franchi et al. (2009), aproximadamente 86% dos clones induzidos pelo lamivudina (3TC) e 76% dos clones induzidos pela estavudina (d4T) foram relacionados com a recombinação mitótica. Estes resultados sugerem que, devido

ao alto índice de recombinação mitótica a exposição aos fármacos pode provocar instabilidade genômica e perda de heterozigose, processo relacionado com a carcinogênese. Moraes Filho (2013), comprovou a indução de recombinação mitótica no DNA causadas pelo fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) e a ausência de efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos induzidos pelo efavirez (EFV) quando testados isoladamente. Adicionalmente, Guimarães et al., 2013 demonstraram que NRTIs isolados são mutagênicos e/ou recombinogênicos e, quando combinados, podem ter potencial sinérgico, aditivo ou antagônico para a indução de mutação e/ou recombinação. Considerando que a AIDS é uma doença crônica de alta incidência, a ampliação dos estudos sobre os efeitos genotóxicos causados pelos medicamentos antirretrovirais, tornam-se fundamental para garantir a segurança dos pacientes que utilizam esses medicamentos (Guimarães et al., 2010).

Adicionalmente, na tentativa de amenizar a virulência do HIV/AIDS houve rápido licenciamento dos antirretrovirais e, consequentemente, rápido aumento das possibilidades de terapias combinadas. No entanto, há pouco conhecimento sobre a segurança desses fármacos a longo prazo, evidenciando assim, a importância do constante monitoramento dessas terapias (Carr e Cooper, 2000). Portanto, com base nesses dados, deve-se aumentar a atenção em relação à toxicidade da HAART.

3. Organismos modelo: Drosophila melanogaster e Mus musculus

O inseto *D. melanogaster* é um organismo eucarioto, diploide, com um total de quatro pares de cromossomos, sendo três deles portadores da maior parte do genoma. Essa espécie vem sendo utilizada em estudos da área de Genética desde o início do século XX, em estudos de genética mendeliana, seleção natural e teoria cromossômica da herança. Desde então, esse inseto passou a ser utilizado para diversos outros estudos da área incluindo transmissão de caracteres hereditários, interação gênica, aberrações cromossômicas, evolução, entre outros (Freire-Maia e Pavan, 1949; Fonseca e Pereira, 2004).

Apesar da *Drosophila melanogaster* possuir aproximadamente 17.000 genes a menos que os humanos, ambas espécies apresentam similaridades genéticas, bioquímicas e fisiológicas. As rotas bioquímicas e funções regulatórias entre as duas espécies são muito conservadas e, vários genes estudados na *D. melanogaster*

provaram ser homólogos aos genes supressores de tumor e oncogenes humanos. Cerca de 75% dos genes relacionados a doenças humanas, entre eles os relacionados a regulação do ciclo celular, são homólogos aos da mosca-da-fruta (Miklos e Rubin, 1996; St. John e Xu, 1997; Bier, 2005; Lloyd e Taylor, 2010; Pandey e Nichols, 2011).

Além desses genes, fatores transcricionais e seus reguladores, proteínas cromossomais, estruturais e sinalizadoras, canais iônicos, genes homeobox e a enzima desoxirribonucleosídeo quinase (Dm-dNK) apresentaram semelhanças entre *Drosophila* e mamíferos (Johansson et al., 1999). Portanto, devido a tanta similaridade, destaca-se a relevância de estudos que utilizam esse organismo modelo para o esclarecimento de problemas de saúde humana, inclusive ciclo celular e câncer. Além disso, existem várias linhagens de *Drosophila* com marcadores moleculares e propriedades diversas que auxiliam as manipulações genéticas e são bem conhecidas cientificamente (Kornberg e Krasnow, 2000).

Por esses motivos, a *D. melanogaster* é amplamente empregada como organismo modelo nas diversas áreas, destacando-se genética, biologia molecular, fisiologia, comportamento, desenvolvimento e ecologia. Dentre as diversas áreas, essa espécie tem sido utilizada constantemente em testes de genotoxicidade, pois acrescenta-se a essas vantagens acumuladas sobre o seu genoma, o rápido ciclo de vida, a fácil manipulação laboratorial e a capacidade de realizar algumas ativações metabólicas semelhantes às que acontecem em mamíferos (Sobels e Vogel, 1976; Adams et al., 2000; Lenz et al., 2013).

Além de participar de estudos para a detecção de agentes genotóxicos e antigenotóxicos, a *Drosophila* tornou-se um excelente modelo em estudos dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos de mutagênese e carcinogênese, podendo fornecer respostas relevantes, que podem ser extrapoladas para mamíferos superiores (Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004).

As linhagens mutantes de *Drosophila* são bem caracterizadas e possuem uma variedade de marcadores que permitiram a criação de vários sistemas-teste. Estes ensaios são capazes de detectar os mais variados tipos de eventos genéticos, como mutações gênicas, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica (Graf et al., 1984; Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004).

Complementarmente, o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos, indica a utilização desse organismo para minimizar questões bioéticas quanto ao uso

de mamíferos em testes toxicológicos (Festing et al., 1998; Benford et al., 2000; Siddique et al., 2005).

Apesar de existirem métodos alternativos *in vitro*, os modelos animais são amplamente utilizados porque apresentam a vantagem de fornecer informações do organismo como um todo. Dentre esses animais, além da *D. melanogaster*, o camundongo da espécie *Mus musculus* é um dos organismos mais utilizados, este apresenta 20 pares de cromossomos e um grande número de mutantes geneticamente conhecidos (Chorilli et al., 2007).

De acordo com Santos (2002), além das similaridades genéticas com humanos, o camundongo destaca-se como organismo modelo pelo curto período de gestação, por ser muito prolífero e pela fácil domesticação e manutenção devido ao seu tamanho.

Geneticamente, existe uma grande semelhança entre camundongos e humanos, pois 99% dos genes humanos foram mapeados em camundongos. Dessa maneira, esses animais são utilizados constantemente em pesquisas que buscam a cura de doenças, o desenvolvimento de novos produtos, vacinas, medicamentos ou cosméticos e em estudos de carcinogenicidade (Chorilli et al., 2007).

Ainda, segundo Carvalho e Lopes (2006), os mecanismos fisiológicos dos camundongos e dos humanos são próximos e, por ser possível inativar genes específicos, é interessante o emprego desse organismo modelo em pesquisas, pois a possibilidade de utilizar diversas linhagens geneticamente modificadas contribui com informações relevantes para diversas patologias.

4. Genética toxicológica e testes utilizados

A genética toxicológica é uma sub-área da genética que engloba estudos relacionados a efeitos genotóxicos, considerados como precursores para o desenvolvimento de neoplasias, como o câncer, por exemplo (Silva et al., 2003). Uma substância genotóxica é aquela capaz de causar danos no material genético, podendo causar uma toxicidade que abrange desde o nível celular (citotóxica) até o organismo (tóxica) (Erdtmann, 2003). Por ser capaz de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética, a substância genotóxica pode ou não ser mutagênica (Fairbairn et al., 1995), visto que o composto mutagênico é aquele capaz de aumentar a taxa de mutação (mudança estável e herdável numa sequência nucleotídica do DNA) em um organismo além da taxa espontânea (Gatehouse et al., 1990). Embora sejam mais raras, podem

ocorrer mutações favoráveis às células, mas em sua maioria, elas são deletérias à célula, podendo causar carcinogênese e teratogênese (Lehninger et al., 1995; Nunes, 2000). Portanto, agentes mutagênicos são sempre genotóxicos, mas agentes genotóxicos nem sempre são mutagênicos (Vogel, 1989).

Vários testes estão disponíveis para realizar a avaliação tóxico genética de um agente físico ou químico. Cada método avalia um nível específico de dano, tais como, lesões no DNA, danos cromossômicos, eventos mutagênicos e recombinogênicos. Portanto, é imprescindível a utilização de vários ensaios em estudos quantitativos dos eventos genotóxicos atribuídos para cada agente, assim como, para o entendimento dos mecanismos de formação das alterações e da ação do reparo de DNA (Silva et al., 2003).

No entanto, realizar avaliação da atividade genotóxica de novos fármacos é relevante para a introdução de compostos com menos efeitos colaterais. Adicionalmente, quando avalia-se o potencial genotóxico dos fármacos existentes, remete-se à busca de novos compostos (Santos et al., 2007).

Dentre os diversos testes existentes, o Ensaio Cometa é muito utilizado para avaliar genotoxicidade e reparo do DNA, porque avalia lesões passíveis de reparo. Dentre as suas vantagens, destacam-se a possibilidade da utilização de vários tipos de células em diferentes organismos por detectar tipos de danos celulares distintos (Singh et al., 1998; Hartmann et al., 2004; Carmona et al., 2011a; Carmona et al., 2011b; Goldschalk et al., 2013; Guanggang et al., 2013; Collins et al., 2014; Kraynak et al., 2015; Ogiwara et al., 2015).

Esse teste é utilizado para detectar danos no DNA causados por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Na versão neutra do teste é possível detectar quebras duplas das moléculas de DNA e *crosslinks*, enquanto a versão alcalina detecta quebras de fita simples e dupla, sítios álcalilábeis e *crosslinks*. O Ensaio Cometa pode ser aplicado em qualquer tipo celular nucleado de organismos eucariotos, independente das células estarem ou não em proliferação (Villela et al., 2003; Kraynak et al., 2015; Ogiwara et al., 2015).

Outro teste que tem sido amplamente utilizado na avaliação do potencial mutagênico de substâncias-teste é o Teste do Micronúcleo (MN) (Maffei et al., 2002; Chung et al., 2002; Ding et al., 2003; Kraynak et al., 2015, Ogiwara et al., 2015; Rim e Kim, 2015). Esse bioensaio é aplicado para detectar agentes clastogênicos (que causam alterações estruturais nos cromossomos) e aneugênicos (indutores de alterações

numéricas, seja por aneuploidia ou por segregação cromossômica anormal), portanto, avalia danos no DNA em nível cromossômico (Heddle, 1973; Rim e Kim, 2015). Os micronúcleos representam o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, devido a ação de agentes físicos, químicos ou biológicos que causaram um dano genético no cromossomo (Villela et al., 2003; Rim e Kim, 2015).

Esse teste pode ser aplicado em populações celulares que estão constantemente em divisão, por isso é amplamente executado em células da medula óssea de mamíferos, uma vez que suas células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de divisão celular (Heddle,1973; Kraynak et al., 2015; Ogiwara et al., 2015). Entre 10 e 24 horas, os eritrócitos imaturos ou eritrócitos policromáticos (EPC) apresentam RNA ribossômico e, nesse estágio, pode-se detectar o aparecimento de MN. Posteriormente, diferenciam-se em eritrócitos maduros ou normocromáticos (ENC) que não possuem RNA ribossômico (Rabelo-Gay, 1991; Krishna e Hayashi, 2000).

Tanto o Ensaio Cometa quanto o Teste do MN não são capazes de detectar a indução de recombinação mitótica, que é um dos principais processos envolvido com a carcinogênese, mediada por agentes genotóxicos (Andrade e Lehmann, 2003). Portanto, torna-se importante a aplicação do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART). Esse bioensaio realiza a detecção simultânea de eventos mutacionais e recombinação mitótica, além de possibilitar a quantificação desses eventos com o intuito de avaliar a contribuição de cada um deles para a genotoxicidade total dos medicamentos em estudo (Graf et al., 1984; Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004; Ávalos et al., 2015; Koksal e Gurbuzel, 2015).

O SMART se baseia no conceito de que durante o desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster*, grupos de células - discos imaginais – se proliferam mitoticamente para formar as partes do corpo da mosca adulto. A perda de heterozigose de dois genes marcadores recessivos (*mwh* e flr^3) pode levar à formação de clones de células mutantes que são expressas fenotipicamente como manchas contendo pelos mutantes, presentes nas células das asas de moscas adultas (Graf et al., 1984; Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004; Ávalos et al., 2015; Koksal e Gurbuzel, 2015).

5. Objetivos

- Geral

Avaliar o efeito tóxico, citotóxico e genotóxico dos antirretrovirais EFV e TDF administrados isolados e em combinações (Combivir+EFV e TDF+3TC).

- Específicos

I) Avaliar o efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico dos medicamentos antirretrovirais EFV e TDF isolados e em combinações (Combivir+EFV e TDF+3TC) por meio do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* e camundongos *Mus musculus*.

II) Avaliar o efeito mutagênico, recombinogênico e tóxico dos medicamentos antirretrovirais em estudo por meio do SMART em *Drosophila melanogaster*.

III) Avaliar o efeito aneugênico e clastogênico das combinações de medicamentos antirretrovirais (Combivir+EFV e TDF+3TC) em medula óssea de camundongos *Mus musculus* por meio do Teste MN.

IV) Quantificar a frequência dos diferentes eventos genotóxicos (mutagênicos, recombinogênicos, aneugênicos e clastogênicos) induzidos pelos combinados que possuem EFV e TDF pelo Teste MN e SMART em *Drosophila melanogaster* e camundongos *Mus musculus*.

V) Comparar os possíveis efeitos genotóxicos dos medicamentos antirretrovirais em estudo quando utilizados isoladamente e em combinações por meio do Ensaio Cometa e SMART em *Drosophila melanogaster*.

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

1. Agentes antirretrovirais

Os medicamentos Viread[®], Lamivudina, Estiva-600[®] e Combivir[®] foram utilizados neste estudo. Cada comprimido de Viread[®] contém 300 mg de TDF (CAS 202138-50-9); o comprimido de Lamivudina contém 150 mg de 3TC (CAS 134678-17-4); o comprimido de ESTIVA-600 contém 600 mg de EFV (CAS 154598-52-4) e o comprimido de Combivir[®] contém 300 mg de AZT (CAS 30516-87-1) mais 150 mg de 3TC. Todos os medicamentos foram cedidos pelo Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad (HDT, Goiânia, GO, Brasil). As estruturas químicas dos antirretrovirais estão representadas na Figura 1.



Figura 1. Estrutura química dos agentes antirretrovirais

Todas as concentrações utilizadas foram determinadas de acordo com a proporção que é administrada aos pacientes em tratamento antirretroviral: EFV+Combivir (AZT+3TC) = 4:2:1 e TDF+3TC = 2: 1.

As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e em todos os experimentos o solvente (água destilada) foi utilizado como controle negativo.

2. Testes com Drosophila melanogaster

Nos testes com *D. melanogaster* foram realizados experimentos com os medicamentos isolados (Combivir; EFV; TDF e 3TC) e combinados (Combivir+EFV; TDF+3TC) para comparar a contribuição genotóxica dos medicamentos individuais e em combinação.

Para definir as concentrações que seriam utilizadas nos testes, foram realizados experimentos piloto de acordo com a solubilidade máxima do EFV e do TDF. Foram utilizadas as concentrações que não apresentaram dose letal maior que 70% (DL 70) nas curvas de sobrevivência, ou seja, concentrações nas quais o número de adultos sobreviventes eram igual ou superior a 30%. A partir desse resultado, foram calculadas as concentrações dos combinados baseadas na proporção utilizada em pacientes. As mesmas concentrações foram utilizadas para os dois testes.

2.1 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O SMART investiga a ocorrência de lesões em nível de DNA, por meio da análise e quantificação de pelos mutantes presentes nas asas de *D. melanogaster*. Essas alterações ocorrem nas células dos discos imaginais que, por sucessivas divisões mitóticas, darão origem às asas dos adultos, ocasionando a perda de heterozigose de dois genes marcadores para forma dos pelos presentes nas asas: os genes *mwh* e *flr*³ (Graf et al., 1984; Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004).

O gene selvagem origina um pelo por célula. O gene *mwh* origina pelos múltiplos (Figura 2a) e o gene *flr³*, pelos geralmente com formato de chama de vela (Figura 2b), indicando a ocorrência de lesões mutacionais e/ou recombinacionais.



Figura 2. Visualização dos fenótipos de: (A) pelos múltiplos e (B) pelo flare

2.1.1 Linhagens teste de D. melanogaster

No presente trabalho foram utilizadas as linhagens com as seguintes características genotípicas: (i) $\mathbf{flr}^3 - flr^3/In(3LR)TM3,rip^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S$ (Figura 3a); (ii) **mwh** - *mwh/mwh* (Figura 3b) e (iii) **ORR;flr**³ – *ORR/ORR;* $flr^3/In(3LR)TM3,rip^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S$. Essas linhagens são portadoras de genes marcadores específicos, localizados no braço esquerdo do cromossomo 3, que permitem monitorar eventos relacionados com mutação gênica, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica. Fenotipicamente, a linhagem flr³ assemelha-se a linhagem ORR;flr³, no entanto essa última possui alto nível de enzimas de metabolização (CYP)6A2, sendo, portanto, utilizada para avaliar compostos que dependem de ativação via citocromo P450 (Graf e van Schaik, 1992).



Figura 3. Linhagens teste de D. melanogaster: (A) flr³, (B) mwh.

2.1.2 Procedimento experimental e tipos de larvas

Para a realização do SMART, larvas de 3º estágio oriundas do cruzamento padrão (ST – *standard cross*) - 40 machos mwh x 80 fêmeas flr³ - foram distribuídas em frascos contendo 0,9 g de meio de cultura alternativo (purê de batata) e 3 mL das

soluções de tratamento e permaneceram até atingirem o estágio de pupa (tratamento crônico). As larvas foram distribuídas em dois frascos de cada concentração, inclusive em frascos somente com água destilada (controle negativo). Em um dos frascos foram colocadas exatamente 100 larvas e os adultos sobreviventes foram contados para a determinação da curva de sobrevivência. Enquanto que, no outro frasco, foram colocadas aproximadamente 100 larvas e, todos os adultos que nasceram dos dois frascos de cada concentração, em 10-12 dias após a postura dos ovos, foram conservados em etanol 70% para posterior montagem das lâminas das asas e análise dos tricomas presentes. Por meio deste procedimento experimental, as células dos discos imaginais ficaram expostas às diferentes soluções de tratamento por 5 a 6 ciclos de divisão mitótica - o que corresponde a 95% de todas as divisões celulares que ocorrem desde o desenvolvimento do embrião até o início da pupação (Frei e Würgler, 1988). O mesmo procedimento foi realizado para o cruzamento aprimorado (HB) - 40 machos mwh x 80 fêmeas ORR;flr³ (Andrade e Lehmann, 2003; Graf e van Schaik, 1992).

As larvas provenientes desses cruzamentos deram origem a indivíduos adultos de duas constituições genotípicas: (i) MH – trans-heterozigotos para os marcadores recessivos *mwh* e $flr^3(mwh +/+ flr^3)$ e (ii) BH - heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3 (*mwh* +/*TM3*, *Bd*^S). O cromossomo TM3 é indispensável para manter a heterozigose do gene marcador *flare* (*flr*³) na linhagem parental e contém múltiplas inversões, tornando inviáveis os produtos de recombinação. Dessa forma, os indivíduos expressam somente mutações gênicas e aberrações cromossômicas. O gene marcador *Bd*^S determina a forma recortada das asas das moscas adultas, permitindo facilmente a sua diferenciação em relação ao genótipo MH, que determina a forma arredondada das asas. (Graf et al., 1984; Andrade e Lehmann, 2003; Andrade et al., 2004).

2.1.3 Montagem e análise microscópica das lâminas

Os adultos conservados em etanol 70% tiveram suas asas retiradas do corpo com o auxílio de duas pinças de relojoeiro (n. 5), e em seguida, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 mL de água e 50 mL de hidrato de cloral) para a montagem das lâminas com 5 pares de asas de fêmeas e 5 pares de asas de machos. Após ficarem na temperatura ambiente por 24 horas, as lâminas foram cobertas com lamínulas (24x32 mm) e cubos de metal de aproximadamente 400 g para auxiliar na fixação das asas sobre a lâmina. Após 24 horas, o peso foi retirado e a lamínula foi fixada com esmalte. A relação entre o total de manchas da progênie MH e o total de

manchas da progênie BH possibilita avaliar o potencial recombinôgenico dos compostos (Andrade et al., 2004).

A superfície dorsal e ventral das asas dos adultos, contendo aproximadamente 24.400 células, foram analisadas em microscópio óptico de luz com aumento de 400x (Andrade e Lehmann, 2003).

2.1.4 Bases genéticas e classificação das manchas

Os pelos mutantes ocorrem em manchas ou clones com fenótipos característicos. Nas manchas mwh, as células expressam pelos múltiplos, ou seja, três ou mais pelos em cada célula. Nas manchas flr³, os pelos mutantes flr³ se expressam como pelos com a base alargada e com formato de chama de vela.

Essas manchas foram classificadas como: (i) mancha simples (ocorrem somente fenótipos mwh ou flr³), originadas por mutação pontual, alteração cromossômica ou recombinação mitótica e (ii) manchas gêmeas (ocorrem os fenótipos mwh e flr³ simultaneamente), indicando, exclusivamente, a ocorrência de recombinação mitótica entre o centrômero e o *locus flr³*. As manchas simples foram divididas em pequena (uma ou duas células mutantes) e grande (três ou mais células mutantes). São consideradas como manchas distintas, aquelas que são separadas por três ou mais pelos normais. O número total de manchas induzidos em um grupo tratado fornece dados quantitativos sobre a atividade mutagênica e/ou recombinogênica do composto (Andrade et al., 2004).

2.1.5 Análise estatística

A avaliação dos efeitos tóxico genéticos foi realizada por meio da comparação entre a frequência de manchas mutantes dos grupos tratados e o controle negativo. O diagnóstico estatístico foi obtido através do teste binomial condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), seguindo um procedimento de múltiplas escolhas proposto por Frei e Würgler (1988), testando as hipóteses: (i) H₀: não há diferença entre a frequência de mutação do grupo controle (frequência espontânea) e do grupo tratado; (ii) H_A: a frequência de mutações do grupo tratado é *m* vezes maior que a do grupo controle, visto que *m* é um fator de correção utilizado para minimizar a possibilidade de ocorrência de falso positivo, sendo m=2 para manchas simples pequena e total de manchas e m=5para manchas simples grande e manchas gêmeas (devido a menor frequência) (Frei e Würgler, 1988; Graf et al., 1984). Dependendo da avaliação das hipóteses (aceita ou rejeitada), há quatro possíveis diagnósticos: (i) positivo – aceita-se H_A e rejeita-se H_0 ; (ii) negativo – aceita-se H_0 e rejeita-se H_A ; (iii) inconclusivo – aceita-se ambas hipóteses e (iv) fraco positivo – rejeita-se ambas hipóteses (Andrade e Lehmann, 2003).

2.1.6 Cálculo do Índice de Combinação (IC)

De acordo com o príncipio da aditividade de Loewe (1957), utilizou-se a frequência de indução de clones por 10^5 células, corrigidas pelo controle negativo, para calcular o índice de combinação (IC) entre os fármacos (Ramakrishnan e Jusko, 2001; Guimarães et al., 2013). Portanto, IC = $[(f_A / f_{AB}) + (f_B / f_{AB})]$, onde f_A e f_B são as frequências induzidas por cada fármaco individualmente (A ou B) e f_{AB} as frequências induzidas pelos fármacos em combinação (AB). Os resultados IC<1, IC=1 e IC>1 representam a ocorrência de sinergismo, aditividade e antagonismo, respectivamente.

2.2 Ensaio Cometa com D. melanogaster

Foi aplicada a versão alcalina do Teste Cometa *in vivo* com hemócitos de *D. melanogaster*, que são as células correspondentes aos linfócitos do sangue dos mamíferos, para avaliar os níveis de danos no DNA causados pelos antirretrovirais isolados e combinados (Carmona et al., 2011a; Carmona et al., 2011b).

2.2.1 Linhagem teste

Nesse estudo foi utilizada a linhagem Oregon R^+ de *D. melanogaster* que é eficiente para todos os tipos de mecanismos de reparo do DNA. A linhagem foi cultivada em frascos de vidro contendo meio de cultura para *D. melanogaster* em uma temperatura de 25°C e umidade relativa de aproximadamente 60%.

2.2.2 Extração da hemolinfa

Para o procedimento experimental, larvas de terceiro estágio foram inseridas em tubos de tratamento contendo 0,9 g de meio de cultura alternativo (purê de batata) e 3 mL das soluções de tratamento nas mesmas concentrações utilizadas no SMART. Os medicamentos foram diluídos em água destilada, a hora do tratamento, e o solvente foi

utilizado como controle negativo. O grupo controle positivo foi tratado com ciclofosfamida na concentração de 1 mg/mL. As larvas se alimentaram por 24 ± 2 horas.

Foram utilizadas 60 larvas por tubo de tratamento e cada concentração foi realizada em triplicata, portanto, para cada concentração foram analisados hemócitos de 180 larvas.

Os hemócitos foram coletados de acordo com o protocolo de Carmona et al., (2011a) e Carmona et al. (2011b), com modificações. As larvas de 96 ± 2 horas foram removidas dos tubos de tratamento, lavadas duas vezes em água, para a retirada de resíduos do meio de cultivo, e resfriadas a 4°C por 1 minuto para facilitar a manipulação por meio da diminuição metabólica. As cutículas de 60 larvas foram desfeitas com o auxílio de bisturi e pinça de relojoeiro nº 5. A hemolinfa, contendo os hemócitos circulantes, foi coletada em solução de EDTA e colocadas em uma lâmina escavada. Em seguida, o *pool* de células das 180 larvas foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. De acordo com Braun et al. (1998), há em torno de 1.000 a 1.500 hemócitos por larva. Na fase larval, existem três subtipos de hemócitos: (i) plasmócitos que representam cerca de 95% dos hemócitos; (ii) células cristais, encontradas em larvas saudáveis. Contudo, a necessidade de um *pool* de células partiu em decorrência de poucas células por indivíduos.

Em cada tubo de microcentrífuga havia um volume final de EDTA+hemolinfa de 0,5 mL. O *pool* de hemolinfa foi centrifugado, duas vezes, a 3.000 rpm por 3 minutos. Seguidamente, 100 μ L do sobrenadante foi descartado para diminuir impurezas e, consequentemente, aumentar a qualidade das amostras. O *pellet* foi ressuspenso com 100 μ L de EDTA para ser centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores.

2.2.3 Preparo das lâminas e eletroforese

As lâminas foram lixadas, para aumentar a adesão da agarose, lavadas em água destilada, higienizadas com álcool e colocadas para secar em caixas porta-lâminas. Logo após, as lâminas de pré-cobertura foram preparadas por meio de mergulho em solução contendo 100 mL de PBS (tampão fosfato-salino) e 1,5 g de agarose padrão e, posteriormente, ficaram secando *overnight*.

As amostras de células (aproximadamente 60 μ L) foram resuspensas em 100 μ L de solução de agarose de baixo ponto de fusão (agarose *low melting*) e distribuídas em

As lâminas foram cobertas com lamínulas e, imediatamente após a solidificação de agarose (por 10 min a 4 °C), as lamínulas foram removidas, e as lâminas imersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 10 mM Tris; 1% Triton X-100 e 10% DMSO) ajustada para pH 10, e mantidas por 72 h a 4°C em câmara escura. Quando retiradas da solução de lise, as lâminas foram colocadas em uma solução tampão (1M NaOH e 200 mM EDTA, pH > 13) durante 20 min a 4 °C para permitir o desenrolamento do DNA. Na sequência, foi realizada a eletroforese no mesmo tampão durante 20 minutos a 40 V/cm e 300 mA (0,73 V/cm). Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas por 15 minutos com 0,4 M de Tris-HCl (pH 7,5) e, em seguida, fixadas (imersas em etanol absoluto por 5 min) e armazenadas até a análise microscópica.

2.2.4 Análise microscópica

As lâminas foram coradas minutos antes da análise, com 50 μ L de solução de GelRedTM, diluído em água deionizada na proporção de 1:500 μ L por cada gel. Em seguida, as lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2) com aumento de 400X, e na presença do filtro Alexa Fluor 546. Um total de 100 nucléoides por réplica (duas ou mais lâminas), foram selecionados aleatoriamente e analisados utilizando-se o programa de captura de imagens Axiovision versão 4.8.2.0.

Os cometas encontrados foram avaliados com base em dois parâmetros: Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%). De acordo com Silva (2012), o ID classifica os nucleóides em cinco classes (de 0 a 4), considerando-se o comprimento e o tamanho da cauda: (i) classe 0, ausência de cauda, ou seja, sem dano; (ii) classe 1, cauda menor do que o diâmetro da cabeça; (iii) classe 2, cauda até duas vezes o diâmetro da cabeça (iv) classe 3, cauda maior que duas vezes o diâmetro da cabeça e (v) classe 4, sem cabeça (Figura 4).



Figura 4. Imagens de nucleóides de leucócitos humanos, corados por GelRed™ e analisado em microscopia fluorescente. Classificação visual. Fonte Silva, 2012.

Os valores de ID foram calculados, com base na fórmula: $IDtotal = 0.(n^{\circ} de cometas classe 0) + 1.(n^{\circ} classe 1) + 2.(n^{\circ} classe 2) + 3.(n^{\circ} classe 3) + 4.(n^{\circ} classe 4).$

O segundo parâmetro utilizado (FD%), representa a porcentagem de nucleóides que apresentaram danos, em relação ao total de nucleóides e foi calculado pela fórmula: **Frequência de Dano = [(nº total – nº classe 0).100] / nº total**.

2.2.5 Análise estatística

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para verificar a normalidade dos parâmetros do cometa. Sendo atendida a normalidade dos dados, a comparação do índice de dano genômico medido pelo Ensaio Cometa entre o grupo controle e os demais tratamentos foi realizada com base na análise da variância (ANOVA) seguida do teste *Tukey a posteriori*. Em relação a análise entre os grupos controle positivo e controle negativo foi utilizado o Teste T. Em todas as situações foi adotado um nível de significância $\alpha = 0,05$, utilizando o pacote estatístico *Statistical Package of Social Sciences* (SPSS v22).

2.2.6 Cálculo do Índice de Combinação

Com base no ID, foi calculado o índice de combinação (IC): IC = [(IDa/IDab) + (IDb/IDab)]. Este índice calcula os efeitos da interação de substâncias e classifica-os como aditivo (IC = 1), antagônico (IC > 1) ou sinérgico (IC <1) (Loewe , 1957 ; Ramakrishnan e Jusko , 2001; Guimarães et al , 2013).
3. Testes com camundongos Mus musculus

Este estudo teve o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA-PRPPG-UFG) sob o nº 046/13 e seguiu todas as normas de manejo e experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* (Swiss Webster) *out bred*, do sexo masculino, pesando entre 30 e 40g com idade variando de 7 a 12 semanas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG). Antes da realização dos experimentos, os animais permaneceram por 7 dias no Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, local onde foram realizados os experimentos. Cinco animais foram mantidos em cada gaiola de polipropileno com dimensão de 40x30x16 cm forrada com maravalha trocada diariamente, e alimentados com ração comercial e água filtrada, ambos oferecidos *ad libitum*. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente de 25°C, umidade 50±20% e um ciclo de luz 12h claro/12h escuro.

Para o procedimento experimental, grupos de cinco camundongos foram tratados, via gavage, com três concentrações da combinação dos antirretrovirais e sacrificados em diferentes tempos: 24 e 48 horas. Com os camundongos foram realizados experimentos apenas com as combinações dos medicamentos. As concentrações dos combinados foram baseadas no estudo de Von Tungeln et al. (2002) com AZT e 3TC isolados e, a partir delas, utilizou-se a proporção usada em protocolos clínicos: TDF+3TC = 2:1; Combivir (AZT+3TC)+EFV = 2:1:4. Portanto, para o combinado TDF+3TC foram testadas as concentrações: 800+400, 1600+800 e 3200+1600 mg/kg. Para o combinado Combivir+EFV foram testadas as concentrações: 200+100+400, 400+200+800 e 800+400+1600 mg/kg.

O grupo controle negativo foi tratado com água destilada esterilizada enquanto o grupo controle positivo recebeu uma dose padrão de ciclofosfamida (50 mg/kg). Apenas o controle positivo foi administrado via intraperitoneal.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. Em seguida, as epífises foi cortada e a medula óssea lavada com 1 mL de soro fetal bovino a 37°C. Após homogeneização, a solução foi centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado para a preparação das lâminas ser realizada com o precipitado homogeneizado com pipeta Pasteur.

3.1 Ensaio Cometa com medula óssea

O Ensaio Cometa foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Attia et al. (2013), com pequenas modificações. Foi aplicada a versão alcalina do teste (Singh et al., 1998).

As lâminas de pré-cobertura foram preparadas por meio de mergulho em solução contendo 100 mL de PBS (tampão fosfato-salino) e 1,5 g de agarose padrão que, posteriormente, ficaram secando *overnight* na horizontal em temperatura ambiente.

No dia seguinte, as lâminas foram preparadas com 10 µL de amostra da medula óssea homogeneizada e misturada com 120 µL de agarose low-melting (baixa fusão) e imediatamente espalhado nas lâminas de pré-cobertura e acrescido de lamínula. A lâmina com as duas camadas de agarose foi mantida a 4°C por 5 minutos para solidificar a agarose. Após este período, a lamínula foi retirada e as lâminas foram incubadas em uma solução de lise: 2,5M NaCl, 10mM Tris, 100mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1% Triton X-100 e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) em pH 10. As lâminas foram mantidas a 4°C por 24 horas nessa solução. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em tampão de eletroforese (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH > 13,0) por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a eletroforese por 25 minutos, a 25 V e 300 mA e a 4°C. Todo o procedimento foi feito no escuro para prevenir danos ao DNA. Após a eletroforese, as lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização (0,4M Tris, pH 7,5), lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente. Para a captura das imagens, as lâminas foram coradas com 20 µL de brometo de etídeo (0,02 mg/mL), minutos antes da análise. As lâminas foram preparadas em duplicatas e 100 nucleóides foram analisados, 50 nucleóides para cada lâmina. Utilizouse o microscópio de fluorescência Axioplan - Imaging® e o software Isis com um filtro de excitação de 510-560 nm e um filtro barreira de 590 nm, em aumento de 200x.

Os nucleóides foram avaliados pelo *software* OpenComet, versão 1.3 (Figura 5). Foram selecionados os quatro parâmetros mais utilizados para as análises: comprimento da cauda (TL, *tail length*), porcentagem de DNA na cauda (% DNA in tail), momento da cauda (*tail moment*) e momento da cauda de Olive (*OTM*, *Olive Tail Moment*) (Tripathi et al., 2008). O OTM é o resultado da razão entre os parâmetros TL e a porcentagem de DNA na cauda, e tem sido o parâmetro para quantificação de danos no DNA mais comumente utilizado (Collins, 2014).



Figura 5. Imagens de nucleóides capturados do *software* Open Comet, versão 1.3. Figura 5-A, nucleóide com danos no DNA e Figura 5-B nucleóide sem danos no DNA.

Para análise estatística, foi realizado o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey *a posteriori*. Em todas as situações foi adotado um nível de significância α =0,05, utilizando o pacote estatístico *SigmaStat*, versão 3.5.

3.2 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) é utilizado para detectar danos cromossômicos, como clastogênese e aneugênese (Figura 6) (Heddle, 1973; Villela et al, 2003, Ribeiro, 2003).

A análise da indução de MN utilizou a mesma amostra do precipitado contendo células de medula óssea, descrito anteriormente no tópico "Teste com camundongos". Para essa análise, 20 µL da amostra foi transferida para a lâmina e com o auxílio de uma lâmina extensora, fez-se um esfregaço. Após secagem, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto e coradas em soluções de Giemsa tamponada com pH 6,8 por um período de 15 minutos (Heddle, 1973). Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em temperatura ambiente. Em seguida, foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 1000x.



Figura 6. Formação de micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea Fonte: Ribeiro, 2003

Na determinação da citotoxicidade foram computados 2000 eritrócitos policromáticos (EPC), sendo 1000 EPC/lâmina. Simultaneamente, foi determinada a frequência de eritrócitos normocromáticos (ENC) (Figura 7) para realizar o cálculo da razão EPC/ENC, que permite inferir o potencial citotóxico dos medicamentos. Essas frequências foram comparadas com o grupo controle negativo ou positivo pelo teste qui-quadrado. Para comparar a citotoxicidade nos dois tempos (24 e 48 horas), foi realizado o teste qui-quadrado.

As frequências obtidas de MN por 2000 EPC em todos os tratamentos foram comparadas com o grupo controle negativo pelo teste ANOVA, que permite concluir sobre a presença ou ausência da ação clastogênica e/ou aneugênica induzida por estes medicamentos. Para comparar a mutagenicidade nos dois tempos, foi realizado o teste t-Student entre os dados de 24 e 48 horas.

Em todas as situações foi adotado um nível de significância de $\alpha = 0,05$, utilizando o *software* estatístico *SigmaStat*, versão 3.5.



Figura 7. Fotografia de eritrócito policromático micronucleado (seta) Fonte: Roll, 2005

1 2	CAPÍTULO 3
3 4	In vivo genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and
5	tenofovir disoproxil fumarate (TDF) alone and in
6	combinations

Aroldo Vieira de Moraes Filho^{a*}, Cláudia de Jesus Silva Carvalho^a,
Cícero Jorge Verçosa^b, Macks Wendhell Gonçalves^a, Cláudia
Rohde^b, Daniela de Melo e Silva^a, Kênya Silva Cunha^a and Lee
Chen-Chen^a

12

^aLaboratório de Radiobiologia e Mutagênese, Departamento de Genética,
 Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Campus Samambaia, Universidade
 Federal de Goiás (UFG), Caixa Postal 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil
 ^bLaboratório de Genética, Núcleo de Biologia, Centro Acadêmico de Vitória,
 Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua do Alto do Reservatório
 s/n, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

19

*Corresponding author at: Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese,
Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Campus
Samambaia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Caixa Postal 131, 74001970, Goiânia, GO, Brazil.

24 E-mail address: aroldodemoraes@gmail.com (A.V. Moraes Filho)

26 ABSTRACT

This study focuses on the antiretrovirals efavirenz (EFV), a non-nucleoside 27 reverse transcriptase inhibitor, and tenofovir disoproxil fumarate (TDF), an oral 28 29 prodrug of tenofovir analog of adenosine 5'-monophosphate, which belongs to the class of nucleotide reverse transcriptase inhibitors. Both compounds act on 30 the mechanisms of HIV replication, inhibiting the action of reverse transcriptase 31 and thus preventing viral DNA synthesis. The toxic and genotoxic potential of 32 EFV and TDF alone and in combinations {EFV + combivir [zidovudine (AZT) + 33 lamivudine (3TC)] and TDF + 3TC} were assessed using the comet assay and 34 the somatic mutation and recombination test (SMART) in Drosophila 35 melanogaster. The results indicate that EFV was toxic at high concentrations 36 and induced genotoxicity using the comet assay, but showed neither mutagenic 37 nor recombinogenic effects using SMART. In combination with combivir, EFV 38 exhibited antagonic genotoxic effects in both tests. Inversely, TDF did not show 39 toxicity but induced genotoxicity at all concentrations tested in both the comet 40 assay and SMART. The prevalence of recombinogenic events in all treatments 41 with TDF alone and in combination with 3TC was detected using SMART. 42 Homologous recombination is an important parameter to be taken into 43 consideration in the evaluation of carcinogenicity of medicines used in 44 antiretroviral therapy regimens, due to the need for lifelong adherence and the 45 unknown effects of long-term treatments. 46

47

48 *Keywords:* Antiretrovirals; Genotoxic; Mutagenic; Recombinogenic.

50 Highlights

- All medicines tested induced genotoxicity using the comet assay.
- Both combinations tested had antagonistic effects compared to the
 medicines alone using the comet assay.
- Only EFV alone was not mutagenic/recombinogenic using SMART.
- Mitotic recombination was the major event induced by all treatments.
- Both combinations tested had antagonistic effects using SMART.

74

75

76 **1. Introduction**

77

Antiretroviral medicines multiplication 78 prevent the of human immunodeficiency virus (HIV), reducing its virulence although not eliminating it 79 from infected cells. Therefore, the use of these medicines has become essential 80 to increase the length and guality of life of HIV-positive patients, prevent a 81 weakened immune system, and reduce the risk of opportunistic diseases (De 82 Clercq, 2009; Broder, 2010). 83

Efavirenz (EFV) is a component of the system of first-line treatment of HIV 84 infection worldwide and belongs to the first-generation of non-nucleoside 85 reverse transcriptase inhibitors (NNRTI). Taking into account the increasing 86 access to antiretroviral therapy, the potential exposure of the world population 87 to EFV is high (Rakhmanina and van den Anker, 2010). However, EFV can 88 cause hepatocellular adenomas and carcinomas and pulmonary 89 alveolar/bronchiolar adenomas in female mice (Wu et al., 2012). 90

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF), the oral prodrug of tenofovir, belongs to the class of nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTI). This compound, an analog of adenosine 5'-monophosphate, has antiviral activity against hepatitis B virus (HBV) and HIV due to the potential to inhibit the action of HBV and HIV DNA polymerase, stopping the replication of the viral genome (Delaney et al., 2006). TDF has a favorable cytotoxicity profile because it is a very weak 97 inhibitor of DNA polymerases α and β in mammals and mitochondrial DNA 98 polymerase (Lee et al., 2003; De Clercq and Holý, 2005; Delaney et al., 2006). 99 Nonetheless, carcinogenicity studies in animals showed that TDF can cause 100 hepatic adenomas in female mice at high doses (Wu et al., 2012).

As a result of several mutations of HIV genome and failures in treatments with only one medicine, combinations of two or more antiretroviral agents have been required in HIV/AIDS treatment (Bossi et al., 1998; Duan et al., 2001; Re et al., 2003; Turner et al., 2004; Parikh et al., 2006; Ehteshami et al., 2008; Walker, et al., 2009). However, these combinations can enhance the genotoxic effects induced by these medicines alone (Guimarães et al., 2013).

In order to assess the toxic and genotoxic potential of EFV and TDF alone and in combinations, the present study used the comet assay in haemocytes of *Drosophila melanogaster* (Carmona et al., 2011a, 2011b) and the somatic mutation and recombination test (SMART) (Graf et al., 1984; Andrade et al., 2004).

112

113 **2. Materials and methods**

114

115 2.1. Antiretroviral agents

116

The medicines Viread[®] [300 mg TDF (CAS 202138-50-9) per tablet], Lamivudina[®] [150 mg 3TC (CAS 134678-17-4) per tablet], Estiva-600[®] [600 mg EFV (CAS 154598-52-4) per tablet], and Combivir[®] [300 mg zidovudine (AZT, CAS 30516-87-1) + 150 mg lamivudine (3TC) per tablet], kindly donated by the Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad, Goiânia, GO, Brazil, were used
in this study.

All concentrations used were determined according to the proportion of the clinical combination protocols [EFV + combivir (AZT + 3TC) = 4:2:1 and TDF + 3TC = 2:1]. To set these concentrations, pilot experiments were conducted in accordance with the maximum solubility of TDF and EFV. The concentrations should not be higher than 70% lethal dose (LD 70) in the survival curve. Therefore, the concentrations that were below LD 70 were employed for genotoxicity analyses using the comet assay and SMART.

The tablets were sonicated (sonicator model Mini-som, Thornton Eletrônica Ltda, Vinhedo, SP, Brazil) and diluted in distilled water before administration. Solutions and dilutions were prepared immediately before use. In all experiments, the solvent (distilled water) was used as negative control.

134

135 2.2. Comet assay in haemocytes of Drosophila melanogaster

136

The comet assay allows the evaluation of DNA damage associated with alkylation, intercalation, and oxidation (Carmona et al., 2011a, 2011b). The alkaline version of the comet assay *in vivo* using haemocytes of the wild-type of *D. melanogaster* (Oregon R⁺) was employed in this study. The line was maintained in glasses at 25°C and 60% humidity.

For the experimental procedure, 60 third-instar larvae were placed in treatment tubes containing 0.9 g synthetic medium and fed 3 mL different treatment solutions for 24 \pm 2 h (triplicates). The positive control group was 145 treated with 1 mg/mL cyclophosphamide. After that, the larvae were removed from the treatment tubes, washed twice in water, and kept at 4°C for 1 min. The 146 cuticles of 180 larvae were disrupted and the haemolymph and circulating 147 haemocytes were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution 148 and transferred to microcentrifuge tubes to a final volume of 0.5 mL hemolymph 149 + EDTA. The hemolymph pool was centrifuged twice at 3000 rpm for 3 min, a 150 100-µL aliquot of supernatant was discarded, the pellet was resuspended in 100 151 µL EDTA, and centrifuged again under the same conditions, according to the 152 protocol described by Carmona et al. (2011a, 2011b) with modifications. 153

Pre-coated slides were prepared using dip solution containing 100 mL 154 phosphate buffered saline and 1.5 g standard agarose and subsequently drving 155 overnight. The cell samples (approximately 60 μ L) were resuspended in 100 μ L 156 low melting point agarose solution and spread with coverslips on the pre-coated 157 slides in the dark. After gelation (10 min at 4°C), the coverslips were carefully 158 removed and the slides were immersed in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM 159 160 EDTA, 1 M NaOH, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, and 10% DMSO), adjusted to pH 10, and maintained in a dark chamber at 4°C for 72 h. The slides were then 161 placed in a buffer solution (1 M NaOH and 200 mM EDTA, pH > 13) at 4°C for 162 20 min for DNA unwinding. The electrophoresis was performed in the same 163 buffer at 40 V/cm and 300 mA (0.73 V/cm) for 20 min. After the electrophoresis, 164 the slides were neutralized with 0.4 M Tris-HCI (pH 7.5) for 15 min, fixed in 165 absolute ethanol for 5 min, and stored under refrigeration until microscopic 166 analysis. The slides were stained before microscopic analyses with 50 µL 167 GelRed[™] (Biotium, Inc., Fremont, CA, USA) solution, diluted in deionized water 168

(1:500) and examined using epifluorescence microscope Axiolmager M2 (Zeiss,
Jena, Germany) 400X magnification and the filter Alexa Fluor 546 (Zeiss). The
images were acquired and analyzed using the microscope software AxioVision
version 4.8.2.0 (Zeiss). A total of 100 nucleoids per replicate (two or more
slides) were randomly selected and analyzed. Comets were scored and
evaluated based on two parameters, namely damage index (DI) and damage
frequency (DF%).

DI ranks the nucleoids into five classes (0 to 4), according to the length and intensity of the tail: class 0 – no tail, no damage; class 1 – tail smaller than the diameter of the head; class 2 – tail up to twice the diameter of the head; class 3 – tail greater than twice the diameter of the head; class 4 – no head. DI values were calculated based on the formula, $DI_{total} = 0 \times (\text{comets class 0}) + 1 \times$ (comets class 1) + 2 × (comets class 2) + 3 × (comets class 3) + 4 × (comets class 4).

The second parameter used (DF%) is the percentage of the comets that had damage in relation to the total comets, and it was calculated using the formula, $DF = [(total comets - comets class 0) \times 100]/total comets.$

The Kolmogorov-Smirnov test was performed to check the normality of comet parameters. Once the normality of the data was confirmed, the comparison of genomic damage between the control group and the other treatments, measured by the comet assay, was based on the analysis of variance followed by the Tukey's test *a posteriori*. For the analyses of the positive and negative control groups, the Student's t-test was used. The results were considered statistically significant when p < 0.05. The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (version 22.0).

Based on DI, the combination index (CI) was calculated as follows: CI = [(DIa/DIab) + (DIb/DIab)], where a and b are the medicines used in the combinations. CI determines the contribution of each medicine alone in the correspondent combination. With this index, it is possible to calculate the effects of the interaction of substances and rank them as: additive (CI = 1), antagonistic (CI > 1), or synergistic (CI < 1) (Loewe, 1957; Ramakrishnan and Jusko, 2001; Turner et al., 2004).

201

202 2.3. Somatic mutation and recombination test (SMART)

203

SMART detects DNA lesions based on the frequency of mutant spots on the wings of *D. melanogaster*. In the present study, lines with genotypes (i) flr^3 $flr^3/ln(3LR)TM3,rip^0$ sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S and (ii) mwh – *mwh/mwh* were used. These lines are carriers of specific marker genes, located on the left arm of chromosome 3, which allow monitoring events related to point mutation, chromosomal aberrations, and mitotic recombination (Graf et al., 1984; Andrade et al., 2004).

For the experimental procedure, 100 third-instar larvae from the standard cross (ST, flr³ females × mwh males) were transferred to tubes containing 0.9 g synthetic medium and fed 3 mL different treatment solutions and distilled water (negative control) in duplicates, and kept for approximately 48 h (chronic treatment). The emerging adults were counted to calculate the survival ratesand preserved in 70% ethanol for subsequent mounting.

According to the Loewe additivity principle (Loewe, 1957), the control-217 corrected clone induction frequency per 10⁵ cells was used to calculate the CI 218 of the drugs tested (Ramakrishnan and Jusko, 2001; Guimarães et al., 2013), 219 using the formula $CI = [(f_A/f_{AB}) + (f_B/f_{AB})]$, where f_A and f_B are the frequencies 220 induced by each antiretroviral agent individually (A or B) and fAB is the 221 frequency induced by the combination of the medicines (AB). The results were 222 classified into three categories: CI < 1 (synergism), CI = 1 (additive effect), and 223 CI > 1 (antagonism). 224

For the statistical analyses, the frequencies of each mutant spot per individual exposed to the different concentrations of EFV and TDF alone and in combinations were compared to the frequencies observed for the respective negative controls. The statistical diagnosis was obtained using the conditional binomial test of Kastenbaum and Bowman (1970), according to the multiple decision proposed by Frei and Würgler (1988), resulting in four possible diagnoses: positive, negative, inconclusive, and weakly positive.

232

3. Results

234

235 **3.1.** *Toxicity*

236

To establish the toxic effects of each medicine alone and in combination, a pilot experiment was carried out and the results are shown in Fig. 1 and 2.





Fig. 1. Survival curves of *Drosophila melanogaster* treated with different doses
of antiretroviral agents alone and in combinations, assessed using the somatic
mutation and recombination test (SMART). A. Efavirenz (EFV), ST cross; B.
Efavirenz (EFV), HB cross; C. Combivir, ST cross; D. Efavirenz (EFV) +
combivir, ST cross; NC, negative control.

246

Given that at the three highest concentrations of EFV (25, 50, and 100 mg/mL) the survival rate was lower than 30% (7%, 8%, and 3%, respectively), these concentrations were not used in the analyses of genotoxicity. Additionally, the larvae exposed to 12.5 mg/mL EFV could not be analyzed due to the very low number of surviving flies. In the high bioactivation (HB) cross, EFV exhibited toxic effect at the highest concentration. Combivir was not toxic at any

concentrations. The combination EFV + combivir induced toxicity only at the highest concentration, with a 4% survival rate (Fig. 1).

В A Survival (%) Survival (%) 1,25*0,625 + 22. 2. 2. 2. ۍ * • • • ر» ۳. 0,15625 0,625 Concentration (mg/mL) Concentration (mg/mL) С Survival (%) 0.625 Concentration (mg/mL)

Fig. 2. Survival curves of Drosophila melanogaster treated with different doses of antiretroviral agents alone and in combinations, assessed using the somatic mutation and recombination test (SMART). A. Tenofovir disoproxil fumarate (TDF), ST cross; B. Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) + lamivudine (3TC), ST cross; C. Lamivudine (3TC), ST cross; NC, negative control.

The survival rate in the treatments with TDF and TDF + 3TC was higher than 97% at all concentrations, and only the four highest concentrations of TDF were used in the genotoxic analyses (Fig. 2).



268 **3.2.** Comet assay

269

The results obtained for the comet assay are shown in Table 1. The negative and positive control groups were compared to validate the test (data not shown).

The comparison of the antiretroviral agents alone and in combinations to the negative controls showed significant differences for all the treatments at all concentrations tested. Therefore, these medicines increased the genetic damage index in *D. melanogaster* haemocytes. Based on CI, both combinations (EFV + combivir and TDF + 3TC) showed antagonistic effects at all concentrations tested (Table 1).

279

280 3.3. SMART test

281

The results of SMART obtained for ST cross treated with EFV, combivir, and EFV + combivir are shown in Table 2 and treated with TDF, 3TC, and TDF + 3TC are shown in Table 3. The results obtained for the negative controls are within the expected values (Graf et al., 1984; Andrade et al., 2004).

Trans-heterozygous individuals for the recessive markers *mwh* and *flr*³ (MH) treated with all concentrations of EFV did not show significant increase in small single spots and total spots compared to the respective negative controls. Inconclusive results of large single spots and twin spots at the highest concentrations of EFV had no influence on the negative results obtained for total spots (Table 2).

292 **Table 1**

293 Evaluation of the genotoxic effect of antiretroviral agents alone and in combination on the haemocytes of *Drosophila melanogaster*

larvae using the comet assay.

Treatment (mg/mL)		Mean ge	netic damage	per class		Genetic	CI	
	0	1	2	3	4	DI	DF (%)	
Negative control ^A	82.67	16.67	0.67	0	0	18.00	17.33	
Positive control ^B	17.00	28.67	27.00	1.67	15.67	180.33	83.00	
EFV								
0.78125	17.33	49.67	7.67	7.67	17.67	158.67	82.67	
1.5625	12.00	45.67	12.33	11.33	18.67	179.00	88.00	
3.125	17.00	43.67	9.00	10.00	20.33	173.00	83.00	
6.25	25.00	36.67	11.33	10.33	16.67	157.00	75.00	
Combivir (AZT + 3TC)								
0.3906 + 0.1953	11.67	27.67	21.00	15.67	24.00	212.67	88.33	
0.78125 + 0.3906	14.33	23.00	16.33	16.33	30.00	224.67	85.67	
1.5625 + 0.78125	11.00	37.00	20.00	13.33	18.67	191.67	89.00	

3.125 + 1.5625	13.67	37.33	15.67	10.33	23.00	191.67	86.33	
EFV + combivir (AZT + 3TC)								
0.78125 + 0.3906 + 0.1953	14.00	39.33	12.33	10.67	23.67	190.67	86.00	1.95
1.5625 + 0.78125 + 0.3906	15.00	33.67	15.00	13.67	22.67	195.33	85.00	2.07
3.125 + 1.5625 + 0.78125	16.00	34.00	14.00	14.67	21.33	191.33	84.00	1.91
6.25 + 3.125 + 1.5625	18.00	36.33	20.33	11.00	14.33	167.33	82.00	2.08
TDF								
1.25	12.67	49.00	1.33	2.33	34.67	197.33	87.33	
2.5	16.67	49.00	4.67	7.67	22.00	169.33	83.33	
5	13.67	43.33	13.33	7.00	22.67	181.67	86.33	
10	16.00	19.00	9.33	19.33	36.33	241.00	84.00	
3TC								
0.625	16.00	38.33	7.67	14.33	23.67	191.33	84.00	
1.25	15.67	48.67	10.00	12.67	13.00	158.67	84.33	
2.5	15.00	21.67	8.67	22.00	32.67	235.67	85.00	
5.0	11.33	48.00	3.00	7.00	30.67	197.67	88.67	

1.25 + 0.625	13.00	29.00	17.67	15.33	25.00	210.33	87.00	1.85
2.5 + 1.25	12.33	39.00	7.33	6.67	34.67	212.33	87.67	1.54
5 + 2.5	20.33	40.33	11.33	7.67	20.33	167.33	79.67	2.49
10 + 5	18.33	30.00	12.33	9.67	29.67	202.33	81.67	2.17

Abbreviations: class 0, absence of genetic damage; classes 1 to 4, increasing levels of genetic damage; DI, damage index; DF%,

damage frequency; CI, combination index; EFV, efavirenz; AZT, zidovudine; 3TC, lamivudine; TDF, tenofovir.

- ²⁹⁷ ^ANegative control, distilled water.
- ²⁹⁸ ^BPositive control, 1 mg/mL cyclophosphamide.
- 299 Means are the result of triplicates.

300

301

302

303 **Table 2**

- 304 Evaluation of mutagenic and/or recombinogenic effects of the antiretroviral agents efavirenz (EFV) and combivir [zidovudine (AZT)
- + lamivudine (3TC)] isolated and in combination on somatic cells of *Drosophila melanogaster* larvae using the somatic mutation and
- 306 recombination test (SMART).

Treatment (mg/mL)	Individuals	Frequency of	no. of spots) ^A	Total	Frequence induction press	y of clone er 10 ⁵ cells ^D	Recombination	CI ^G		
	(no.)	SSS	LSS	TWS	TOS	mwh	(n/N	VC) ^E	(70)	
		(1-2 cells) ^B	(>2 cells) ^B	m = 5	m = 2	clones ^C				
		m = 2	m = 5							
						(no.)				
							Observed	Control-	-	
								corrected		
EFV (ST cross, <i>mwh/flr³</i>)										
Negative control ^H	60	0.50 (30)	0.07 (4)	0.02 (1)	0.58 (35)	22	1.20			
0.78125	60	0.47 (28)–	0.07 (4)-	0.00 (0)-	0.53 (32)–	32	1.09	-0.10		
1.5625	60	0.47 (28)–	0.02 (1)–	0.00 (0)-	0.48 (29)–	29	0.99	-0.20		
3.125	60	0.38 (23)–	0.08 (0)i	0.03 (2)i	0.50 (30)–	29	0.99	-0.20		
6.25	60	0.53 (32)–	0.03 (2)–	0.07 (4)i	0.63 (38)–	36	1.23	0.03		
EFV (HB cross, <i>mwh/flr³</i>)										
Negative control ^H	60	0.45 (27)	0.05 (3)	0.07 (4)	0.57 (34)	33	1.13			

0.78125	60	0.38 (23)–	0.05 (3)–	0.05 (3)–	0.48 (29)–	29	0.99	-0.14				
1.5625	60	0.37 (22)–	0.05 (3)–	0.03 (2)-	0.45 (27)–	27	0.92	-0.20				
3.125	60	0.37 (22)–	0.10 (6)i	0.08 (5)i	0.55 (33)–	32	1.09	-0.03				
Combivir (AZT + 3TC) (ST cross, <i>mwh/flr³</i>)												
Negative control	40	0.43 (17)	0.18 (7)	0.05 (2)	0.65 (26)	26	1.33					
0.3906 + 0.1953	40	0.83 (33)+	0.33 (13)i	0.23 (9)+	1.38 (55)+	55	2.82	1.49	48.32			
0.78125 + 0.3906	40	1.78 (71)+	1.18 (47)+	0.35 (14)+	3. (132)+	132	6.76	5.43	93.37			
1.5625 + 0.78125	40	3.80 (152)+	3.03 (121)+	1.40 (56)+	8.23 (329)+	328	16.80	15.47	87.72			
Combivir (AZT + 3TC) (ST cros	ss, mwh/	ТМ3)										
Negative control	40	0.30 (12)	0.03 (1)		0.33 (13)	14	0.72					
0.3906 + 0.1953	40	0.63 (25)+	0.08 (3)i	I	0.70 (28)+	46	2.36	1.64				
0.78125 + 0.3906	40	0.45 (18)i	0.05 (2)i		0.50 (20)i	83	4.25	3.53				
1.5625 + 0.78125	40	1.10 (44)+	0.15 (6)i		1.25 (50)+	128	6.56	5.84				
EFV + combivir (AZT + 3TC) (ST cross,	mwh/flr³)										
Negative control	40	0.58 (23)	0.10 (4)	0.05 (2)	0.73 (29)	29	1.49					
0.78125 + 0.3906 + 0.1953	40	0.88 (35)i	0.23 (9)i	0.03 (1)–	1.13 (45)+	45	2.31	0.82	118.29	1.70		
1.5625 + 0.78125 + 0.396	40	1.40 (56)+	0.30 (12)+	0.15 (6)i	1.85 (74)+	74	3.79	2.31	111.25	2.26		
3.125 + 1.5625 + 0.78125	40	1.98 (79) +	0.65 (26)+	0.13 (5)i	2.75 (110)+	109	5.58	4.10	92.44	3.72		
EFV + combivir (AZT + 3TC) (ST cross,	mwh/TM3)										

Negative control	40	0.68 (27)	0.0 (0)		0.68 (27)	25	1.28		
0.78125 + 0.3906 + 0.1953	40	0.45 (18)–	0.10 (4)i	I	0.55 (22)–	22	1.13	-0.15	
1.5625 + 0.78125 + 0.396	40	0.45 (18)–	0.05 (2)i		0.50 (20)–	20	1.02	-0.26	
3.125 + 1.5625 + 0.78125	40	0.75 (30)–	0.03 (1)i		0.78 (31)–	31	1.59	0.31	

- 307 Abbreviations: SSS, small simple spots; LSS, large simple spots; TWS, twin spots; TOS, total spots; m, multiplication factor for the evaluation of significantly
- 308 negative results.
- ^AStatistical diagnosis according to Frei and Würgler (1988): +, positive; –, negative; i, inconclusive (p < 0.05).
- 310 ^BIncluding rare single spots flr^3 .
- 311 ^CConsidering clones mwh for single spots mwh and twin spots.
- ^DCalculated according to Frei et al. (1992).
- 313 ^EC = 48.000, i.e., approximate number of cells examined per individual.
- ⁵Percentage of recombination calculated using the formula: R = 1 [(n/NC in individual mwh/TM3)/(n/NC in individual mwh/flr³)] × 100.
- ³¹⁵ ^GCI calculated using the formula: $CI = [(f_A/f_{AB}) + (f_B/f_{AB})]$, where a and b are the medicines used in the combinations. Control corrected frequencies were used
- 316 for these calculations.
- ³¹⁷ ^HNegative control, distilled water.
- ³¹⁸ ¹Only single spots *mwh* can be observed in heterozygous individuals *mwh/TM3*, since balancer chromosome *TM3* does not contain the mutant gene *flr*³.
- 319
- 320
- 321
- 322

323 Table 3

Evaluation of mutagenic and/or recombinogenic effects of the antiretroviral agents tenofovir (TDF) and lamivudine (3TC) isolated and in combination on somatic cells of *Drosophila melanogaster* larvae using the somatic mutation and recombination test (SMART).

Treatment (mg/mL)	Individuals	Frequency of mutant spots per individual (no. of spots) ^A					Frequency of clone		Recombination	CI ^G
	(no.)	SSS	SSS LSS TWS TOS MW		mwh	mwh (n/NC) ^E		(70)		
		(1-2 cells) ^B	(>2 cells) ^B m = 5	m = 5	m = 2		, ,	,		
						clones				
		m = 2				^c (no.)				
							Observed	Control-		
								corrected		
TDF (ST cross, <i>mwh/flr</i> ³)										
Negative control	40	0.55 (19)	0.05 (2)	0.10 (4)	0.70 (28)	28	1.43			
1.25	40	0.95 (38)+	0.10 (4)i	0.10 (4)–	1.15 (46)+	46	2.36	0.92	150	
2.5	40	0.73 (29)i	0.35 (14)+	0.15 (06)i	1.23 (49)+	48	2.46	1.02	140.20	
5	40	1.08 (43)+	0.48 (19)+	0.33 (13)+	1.88 (75)+	75	3.84	2.41	104.15	
10	40	1.78 (71)+	1.03 (41)+	0.75 (30)+	3.55 (142)+	134	6.86	5.43	96.32	
TDF (ST cross, <i>mwh/</i> TM3)										
Negative control	40	0.63 (25)	0.0 (0)		0.63 (25)	25	1.28			

1.25	40	0.38 (15)–	0.03 (1) i	Ι	0.40 (16)–	16	0.82	-0.46		
2.5	40	0.43 (17)–	0.0 (0)-		0.43 (17)–	17	0.87	-0.41		
5	40	0.53 (21)–	0.05 (2)i		0.58 (23)–	23	1.18	-0.10		
10	40	0.65 (26)–	0.08 (3)i		0.73 (29)–	29	1.49	-0.20		
3TC (ST cross, <i>mwh/flr³</i>)										
Negative control	40	0.45 (18)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.53 (21)	21	1.08			
0.625	40	1.80 (72)+	1.60 (64)+	0.85 (34)+	4.28 (171)+	165	8.45	7.38	94.44	
1.25	40	2.85 (114)+	4.73 (189)+	4.48(179)+	9.50 (380)+	370	18.95	17.88	95.13	
2.5	40	4.78 (191)+	5.60 (224)+	5.55(222)+	12.35 (494)+	475	24.33	23.26	91.19	
5	40	4.55 (182)+	6.38 (255)+	8.68(347)+	14.15 (566)+	546	27.97	26.90	91.23	
3TC (ST cross, <i>mwh/</i> TM3)										
Negative control	40	0.43 (17)	0.0 (0)		0.43 (17)	17	0.87			
0.625	40	0.58 (23)i	0.05 (2)i		0.63 (25)i	25	1.28	0.41		
1.25	40	0.68 (27)i	0.18 (7)+	I	0.85 (34)+	34	1.74	0.87		
2.5	40	0.88 (35)+	0.55 (22)+		1.43 (57)+	57	2.92	2.05		
5	40	0.83 (33)+	0.75 (30)+		1.58 (63)+	63	3.23	2.36		
TDF + 3TC (ST cross, mwh/flr)									
Negative control	40	0.65 (26)	0.05 (2)	0.03 (1)	0.73 (29)	29	1.49			
1.25 + 0.625	40	1.85 (74)+	1.90 (76)+	1.00 (40)+	4.75 (190)+	185	9.48	7.99	92.99	1.04

2.5 + 1.25	40	3.48 (139)+	3.00 (120)+	1.60 (64)+	8.08 (323)+	319	16.34	14.86	94.48	1.27
5 + 2.5	40	4.18 (167)+	4.38 (175)+	2.13 (85)+	10.68 (427)+	419	21.47	19.98	90.49	1.28
10 + 5	40	6. (252)+	5.73 (229)+	2.28 (91)+	14. (572)+	563	100.46	28.84	92.32	1.12
TDF + 3TC (ST cross, mwl	h/TM3)									
Negative control	40	0.65 (26)	0.03 (1)		0.68 (27)	27	1.38			
1.25 + 0.625	40	0.88 (35)i	0.08 (3)i		0.95 (38)i	38	1.95	0.56		
2.5 + 1.25	40	0.78 (31)+	0.30 (12)i	I	1.08 (43)+	43	2.20	0.82		
5 + 2.5	40	1.28 (51)+	0.33 (13)+		1.60 (64)+	64	3.28	1.90		
10 + 5	40	1.38 (55) +	0.33 (13)+		1.70 (68)+	68	3.48	2.10		

327 Abbreviations: SSS, small simple spots; LSS, large simple spots; TWS, twin spots; TOS, total spots; m, multiplication factor for the evaluation of significantly

328 negative results.

^AStatistical diagnosis according to Frei and Würgler (1988): +, positive; –, negative; i, inconclusive (p < 0.05).

- 330 ^BIncluding rare single spots flr^3 .
- ³³¹ ^CConsidering clones mwh for single spots mwh and twin spots.
- ^DCalculated according to Frei et al. (1992).
- $^{\text{E}}$ C = 48.000, i.e., approximate number of cells examined per individual.
- ³³⁴ ^FPercentage of recombination calculated using the formula: R = 1 [(n/NC in individual mwh/TM3)/(n/NC in individual mwh/flr³)] × 100.
- ³³⁵ ^GCI calculated using the formula: $CI = [(f_A/f_{AB}) + (f_B/f_{AB})]$, where a and b are the medicines used in the combinations. Control corrected frequencies were used
- 336 for these calculations.

- ³³⁷ ^HNegative control, distilled water.
- ³³⁸ ¹Only single spots *mwh* can be observed in heterozygous individuals *mwh/TM3*, since balancer chromosome *TM3* does not contain the mutant gene flr^3 .

Since EFV was not genotoxic, the HB cross (ORR; flr3/TM3 Bd^S females × mwh/mwh males) was tested as well. The ORR line carries chromosomes responsible for a high constitutive level of cytochrome P450 enzymes and therefore is effective to detect promutagens and procarcinogens (Graf et al., 1984; Andrade et al., 2004). The three lowest concentrations used in ST cross also EFV were tested in HB cross. and alone was not mutagenic/recombinogenic at any concentrations tested (Table 2). Once bioactivation did not influence EFV genotoxicity, the experiment was carried out only with the ST cross. Combivir and EFV + combivir exhibited genotoxic effects at all concentrations tested with prevalence of recombinogenic effects.

Based on the dose-response increase in frequency of total mutant spots in MH individuals at all concentrations tested, it is possible to infer that TDF promoted DNA damage by inducing mutational and/or recombinational events (Table 3). Given that TDF, combivir, 3TC, TDF + 3TC, and EFV + combivir induced genotoxicity in MH flies, the heterozygous flies for balancer chromosome TM3 (BH) were analyzed in order to quantify the contribution of recombinogenic events.

The recombinogenic potential of TDF was calculated comparing the frequencies of clone induction obtained in MH and BH progenies. At all concentrations tested, the contribution of recombination to total induced genotoxic events was almost 100%. These findings indicate that TDF is predominantly recombinogenic, although it does not induce toxic effects. The same occurred with 3TC and TDF + 3TC, which were predominantly recombinogenic at all concentrations tested.

59

According to our results, both combinations tested, namely EFV + combivir and TDF + 3TC, induced antagonistic effects.

4. Discussion

The purpose of this study was to evaluate the genotoxicity of the antiretroviral agents EFV and TDF alone and in combination with combivir and 3TC, respectively, using the comet assay and SMART in *D. melanogaster*. The deoxyribonucleoside kinases of *D. melanogaster* and some enzymes of mammalian cells have similarities, especially human mitochondrial thymidine kinase 2, with which they share many substrates (Munch-Petersen et al., 1998; Johansson et al., 1999; Solaroli et al., 2003).

The comet assay, one of the tests used to assess genotoxicity and DNA repair, can be used in all cells in many model organisms to detect low levels of cell damage and different types of damage, including single-strand breaks and alkali-labile sites (Hartmann et al., 2004; Dhawan et al., 2009; Carmona et al., 2011a, 2011b; Brennan et al., 2012; Godschalk et al., 2013; Guanggang et al., 2013; Collins et al., 2014; Gaivão and Sierra, 2014)[.]

SMART allows the simultaneous evaluation of two processes related to carcinogenesis: (i) mutations, due to replication damage, environmental factors, or deficiencies in repair mechanism; (ii) homologous recombination, due to loss of heterozygosity of genes involved in cell cycle regulation (Graf et al., 1984; Bishop and Schiestl, 2003; Andrade et al., 2004).

In this study, the toxic and genotoxic effects of EFV were evaluated and the results indicated that this compound was toxic at higher concentrations (12.5, 25, and 50 mg/mL), although it did not show induction of mutagenic and

recombinogenic events. The toxicity results found for this antiretroviral agent corroborate the outcomes of the study conducted by Díaz-Delfin et al. (2011), which showed that at low concentrations (0.5 and 4 μ M), EFV was not significantly cytotoxic, but at 20 μ M it caused extensive cell death.

Despite the low rates of toxicity of many antiretroviral regimens, their effects over decades of treatment are still controversial and not properly established (Richman et al., 2009). Adjene and Igbigbi (2010) suggested that the long-term administration of EFV caused toxic effects on the inferior colliculus of Wistar rats, detected as a decrease in cell number, probably due to cell death induced by this compound.

Bumpus (2011) incubated primary human hepatocytes with 8hydroxyefavirenz (8-OHEFV), the primary metabolite of EFV, which resulted in cell death, caspase-3 activation, and reactive oxygen species formation. The treatment of primary human hepatocytes with EFV and 8-OHEFV stimulated the phosphorylation of both c-Jun N-terminal kinase and its substrate c-Jun, and increased the mRNA and protein expression of an isoform of the proapoptotic protein Bim (Bcl-2, a mediator of cell death). These findings suggest that the oxidative metabolite 8-OHEFV is a more potent inducer of hepatic cell death than EFV. In the present study, EFV caused toxic effects only at the highest concentration tested and did not display genotoxic effects on the HB cross.

In the reviews of genotoxicity and carcinogenicity conducted by Brambilla et al. (2011) and Wu et al. (2012), EFV exhibited no genotoxic effects *in vitro* or *in vivo* using different organisms or cell cultures (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, ovarian cells of Chinese hamster, mice, mammalian cells, and human lymphocytes). In spite of the absence of mutagenic and recombinogenic effects of EFV in the present study, this compound displayed genotoxic effects detected by the comet assay. We suggest that repair mechanisms counteracted the DNA damage induced by EFV, and this could not be detected by SMART, an assay that evaluates fixed lesions.

In relation to combivir, our results are in accordance with those of a previous study that showed absence of toxicity but induction of genotoxic effects at equivalent concentrations of AZT + 3TC (combivir) (Turner et al., 2004). The combination EFV + combivir exhibited antagonic genotoxic, mutagenic, and recombinogenic effects detected as decreases in DI and frequency of total spots compared to combivir alone using the comet assay and SMART, respectively.

Brambilla et al. (2012) performed a review of carcinogenicity of medicines including EFV and TDF, and concluded that the former displayed no effects in all tests, whereas the latter showed positive results in female mice in a long-term assay. According to Brambilla et al. (2011), although TDF did not show genotoxicity in *S. typhimurium* and mice assays, it was genotoxic to L5178Y mouse lymphoma cell line. Additionally, TDF was genotoxic when tested in mammalian cell cultures (Wu et al., 2012).

In a previous study conducted by Guimarães et al. (2013), in our laboratory, 3TC displayed mutagenic and/or recombinogenic effects, although the recombinogenic ones predominated using SMART. In the present study, the combination TDF + 3TC exhibited antagonism for genotoxic effects, both in the comet assay and SMART.

In a review of carcinogenicity induced by medicines authorized in Europe between 1995 and 2009, Friedrich and Olejniczak (2011) reported that EFV was not considered genotoxic and did not promote carcinogenesis in rats, but was carcinogenic to mice. In contrast, TDF was proven to be genotoxic and carcinogenic in rats and mice and to induce lipoma, uterine polyps, duodenal tumors, and hepatic adenoma in mice, therefore representing a carcinogenic risk to humans.

We consider that homologous recombination is an important parameter to be taken into consideration in the assessment of carcinogenicity of drugs used in antiretroviral therapy regimens, due to the need for lifelong adherence and the unknown effects of long-term treatments. Therefore, it is crucial to constantly analyze these medicines alone and in combinations to identify their toxic and genotoxic activities in order to ensure quality of life of patients under monotherapy or highly active antiretroviral therapy.

Acknowledgements: We would like to thank Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad for the donation of the medicines.

Funding: This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

Adjene, J.O., Igbigbi, P.S., 2010. Effects of chronic administration of efavirenz on the inferior colliculus of adult Wistar rats. Fooyin J. Health Sci. 2, 105–108. doi: 10.1016/S1877-8607(11)60007-6

Andrade HHR, Reguly ML, Lehmann M., 2004. Wing somatic mutation and recombination test. In: Henderson, D. S. (ed.) *Drosophila* cytogenetics

protocols. Humana Press, Totowa, p. 389–412. (Methods in molecular biology, 247).

Bishop, A.J.R., Schiestl, R.H., 2003. Role of homologous recombination in carcinogenesis. Exp. Mol. Pathol. 74, 94–105. doi: 10.1016/S0014-4800(03)00010-8

Bossi, P., Yvon, A., Mouroux, M., Huraux, J.M., Agut, H., Calvez, V., 1998. Mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene observed in stavudine and didanosine strains obtained by *in vitro* passages. Res. Virol. 149, 355–361. doi: 10.1016/S0923-2516(99)80003-X Brambilla, G., Mattioli, F., Robbiano, L., Martelli, A., 2011. Studies on genotoxicity and carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs. Mutagenesis 27, 387–413. doi: 10.1093/mutage/ger094 Brambilla, G., Mattioli, F., Robbiano, L., Martelli, A., 2012. Update of carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed

10.1016/j.mrrev.2011.09.002

pharmaceuticals.

Brennan, L.J., Haukedal, J.A., Earle, J.C., Keddie, B., Harris, H.L., 2012. Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. Insect Mol. Biol. 21, 510–520. doi: 10.1111/j.1365-2583.2012.01155.x

Rev.

Mutat.

750,

Res.

1–51.

doi:

Broder, S., 2010. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. Antivir. Res. 85, 1–18. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.002

Toxicol. 31, 211–221. doi: 10.1177/1091581812439585

Mutat. Res.

Bumpus, N.N., 2011. Efavirenz and 8-hydroxyefavirenz induce cell death via a JNK- and BimEL-dependent mechanism in primary human hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257, 227–234. doi: 10.1016/j.taap.2011.09.008

Carmona, E.R., Creus, A., Marcos, R., 2011a. Genotoxicity testing of two leadcompounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. Gen Toxicol. Environ. 724, 35–40. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.05.008

Carmona ER, Guecheva TN, Creus A, Marcos, R., 2011b. Proposal of an in vivo comet assay using haemocytes of *Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen. 52, 165–169. doi: 10.1002/em.20604

Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., Bonassi, S., 2014. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. Mutat. Res. Rev. Mutat. Res. 759, 27–39. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.10.001

De Clercq, E., 2009. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. Int. J. Antimicrob. Agents 33, 7–320. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.010

De Clercq, E., Holý, A., 2005. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. Nat. Rev. Drug Discov. 4, 928–940. doi: 10.1038/nrd1877 Delaney, W.E. IV, Ray, A.S., Yang, H., Qi, X., Xiong, S., Zhu Y., Miller, M.D., 2006. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2471–2477. doi: 10.1128/AAC.00138-06 Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. Cell Biol. Toxicol. 25, 5– 32. doi: 10.1007/s10565-008-9072-z

Díaz-Delfín, J., Gutiérrez, M.M., Gallego-Escuredo, J.M., Domingo, J.C., Mateo, M.G., Villarroya, F., Domingo, P., Giralt, M., 2011. Effects of nevirapine and efavirenz on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. Antivir. Res. 91, 112–119. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.04.018

Duan, C., Poticha, D., Stoeckli, T.C., Petropoulos, C.J., Whitcomb, J.M., McHenry, C.S., Kuritzkes, D.R., 2001. Inhibition of purified recombinant reverse transcriptase from wild-type and zidovudine-resistant clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by zidovudine, stavudine, and lamivudine triphosphates. J. Infect. Dis. 184, 1336–1340. doi: 10.1086/323995

Ehteshami, M., Scarth, B.J., Tcheskonov, E.P., Dash, C., Le Grice, S.F.J., Hallenberger, S., Jochmans, D., Götte, M., 2008. Mutations M184V and Y115F in HIV-1 reverse transcriptase discriminate against "nucleotide-competing reverse transcriptase inhibitors". J. Biol. Chem. 283, 29904–29911. doi: 10.1074/jbc.M804882200

Frei, H., Clements, J., Howe, D., Würgler, F.E., 1992. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of Drosophila melanogaster. Mutat. Res. Gen. Toxicol., 279, 21–33. doi: 10.1016/0165-1218(92)90262-X

Frei, H., Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or

inconclusive result. Mutat. Res. Environ. Mutagen. Rel. Subj. 203, 297–308. doi: 10.1016/0165-1161(88)90019-2

Friedrich, A., Olejniczak, K., 2011. Evaluation of carcinogenicity studies of medicinal products for human use authorised via the European centralised procedure (1995–2009). Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 225–248. doi: 10.1016/j.yrtph.2011.04.001

Gaivão, I., Sierra, M., 2014. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. Front. Genet. 5, 4. doi: 10.3389/fgene.2014.004

Godschalk, R.W., Ersson, C., Riso, P., Porrini, M., Langie, S.A.S., van Schooten, F.J., Azqueta, A., Collins, A.R., Jones, G.D.D., Kwokf, R.W.L., Phillips, D.H., Sozeri, O., Allione, A., Matullo, G., Möller, L., Forchhammer, L., Loft, S., Møller, P., 2013. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: An inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 757, 60–67. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.06.020

Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen. 6, 153–188. doi: 10.1002/em.2860060206

Guanggang, X., Diqiu, L., Jianzhong, Y., Guan Jingmin, Huifeng, Z., Mingan, S., Liming, T., 2013. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. Food Chem. Toxicol. 53, 352–358. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.020

Guimarães, N.N., Silva, C.J., Andrade, H.H.R., Dihl, R.R., Lehmann, M., Cunha, K.S., 2013. Comparative analysis of genetic toxicity of antiretroviral
combinations in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food Chem. Toxicol. 53, 299–309. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.005

Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., Mueller, L., 2004. Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. Mutagenesis 19, 51–59. doi: 10.1093/mutage/geg038

Johansson, M., van Rompay, A.R., Degrève, B., Balzarini, J., Karlsson, A., 1999. Cloning and characterization of the multisubstrate deoxyribonucleoside kinase of *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 274, 23814–23819. doi: 10.1074/jbc.274.34.23814

Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 9, 527–549. doi: 10.1016/0027-5107(70)90038-2

Lee, H., Hanes, J., Johnson, K.A., 2003. Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase. Biochemistry 42, 14712–14719. doi: 10.1021/bi035596s

Loewe, S., 1957. Antagonisms and antagonists. Pharmacol. Rev. 9, 237–242. Munch-Petersen, B., Piskur, J., Søndergaard, L., 1998. Four deoxynucleoside kinase activities from *Drosophila melanogaster* are contained within a single monomeric enzyme, a new multifunctional deoxynucleoside kinase. J. Biol. Chem. 273, 3926–3931.

Parikh, U.M., Bacheler, L., Koontz, D., Mellors, J.W., 2006. The K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase exhibits bidirectional phenotypic antagonism with thymidine analog mutations. J. Virol. 80, 4971–4977. doi: 10.1128/JVI.80.10.4971-4977.2006 Rakhmanina, N.Y., van den Anker, J.N., 2010. Efavirenz in the therapy of HIV infection. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 6, 95–103. doi: 10.1517/17425250903483207

Ramakrishnan, R., Jusko, W.J., 2001. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. Int. Immunopharmacol. 1, 2035–2042. doi: 10.1016/S1567-5769(01)00132-1

Re, M.C., Bon, I., Monari, P., Borderi, M., Gibellini, D., Schiavone, P., Vitonea, F., Chiodo, F., La Placa, M., 2003. Mutation patterns of the reverse transcriptase genes in HIV-1 infected patients receiving combinations of nucleoside and non nucleoside inhibitors. Int. J. Antimicrob. Agents 22, 388–394. doi: 10.1016/S0924-8579(03)00082-7

Richman, D.D., Margolis, D.M., Delaney, M., Greene, W.C., Hazuda, D., Pomerantz, R.J., 2009. The challenge of finding a cure for HIV infection. Science 323, 1304–1307. doi: 10.1126/science.1165706

Solaroli, N., Bjerke, M., Amiri, M.H., Johansson, M., Karlsson, A., 2003. Active site mutants of *Drosophila melanogaster* multisubstrate deoxyribonucleoside kinase. Eur. J. Biochem. 270, 2879–2884. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03666.x

Turner, D., Brenner, B., Wainberg, M.A., 2004. Relationships among various nucleoside resistance-conferring mutations in the reverse transcriptase of HIV-1. J. Antimicrob. Chemother. 53, 53–57. doi: 10.1093/jac/dkh009

Walker, D.M., Kajon, A.E., Torres, S.M., Carter, M.M., McCash, C.L., Swenberg, J.A., Upton, P.B., Hardy, A.W., Olivero, O.A., Shearer, G.M., Poirier, M.C., Walker, V.E., 2009. WR1065 mitigates AZT-ddl-induced mutagenesis and inhibits viral replication. Environ. Mol. Mutagen. 50, 460–472. doi: 10.1002/em.20482

Wu, K.M., Powley, M.W., Ghantous, H., 2012. Timing of carcinogenicity studies and predictability of genotoxicity for tumorigenicity in anti-HIV drug development. Int. J. Toxicol. 31, 211–221. doi: 10.1177/109158181243958

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY (FATOR DE IMPACTO: 3.847)

Subr	nission Confirmation to Toxicology and Applied Pharmacology		Entrada x	ē 2
+	TAAP <tox@elsevier.com> para mim ▼</tox@elsevier.com>		26 de set $\stackrel{\wedge}{\searrow}$	* *
₹ _A	inglês		Desativar para:	inglês 🗙
	Article Type: %ARTICLE TYPE% Dear Mr. Vieira de Moraes Filho,			
	Your submission entitled "In vivo genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofor alone and in combinations" has been received for consideration in Toxicology and Ap	ovir di plied	isoproxil fumarate Pharmacology.	(TDF)
	Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e- reference.	mail v	vith this number fo	or your
	Thank you for submitting your work to Toxicology and Applied Pharmacology.			
	Kind regards,			
	Nalini Kannan Journal Manager Toxicology and Applied Pharmacology			

For further assistance, please visit our customer support site at http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more Ativar (about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further Acesse Ci assistance from one of our customer support representatives.

1	CAPÍTULO 4
2	
3	Genotoxic and Cytotoxic Effects of Antiretroviral Combinations
4	in Mice Bone Marrow
5	
6	Short title: Genotoxic and Cytotoxic Effects of Antiretroviral Combinations in Mice
7	
8	Aroldo Vieira de Moraes Filho ¹ *, Cláudia de Jesus Silva Carvalho ¹ , Cristiene
9	Costa Carneiro ¹ , Camila Regina do Vale ¹ , Débora Cristina da Silva Lima ¹ ,
10	Wanessa Fernandes Carvalho ¹ , Thiago Bernardi Vieira ² , Daniela de Melo e
11	Silva ¹ , Kênya Silva Cunha ¹ and Lee Chen-Chen ¹
12	
13	¹ Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, Departamento de Genética, Instituto
14	de Ciências Biológicas (ICB), Campus Samambaia, Universidade Federal de Goiás
15	(UFG), Caixa Postal 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil, ² Programa de Pós-
16	Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade do Estado de Mato Grosso,
17	Campus Universitário de Nova Xavantina, BR 158, Caixa Postal 8, 78.690-000, Nova
18	Xavantina, MT, Brazil
19	
20	* aroldodemoraes@gmail.com
21	
22	The authors contributed equally to this work.
23	

24 Abstract

Commonly used guidelines for the management of human immunodeficiency virus 25 (HIV) infection (highly active antiretroviral therapy, HAART) include drug 26 combinations such as tenofovir disoproxil fumarate (TDF) + lamivudine (3TC) and 27 combivir [zidovudine (AZT) + 3TC] + efavirenz (EFV). These combinations may 28 enhance the genotoxic effects induced by such drugs individually, since the therapy 29 30 requires lifelong adherence and the drugs have unknown effects during treatment. Thus, the evaluation of the benefits and risks of HAART is of great importance. In 31 order to assess the cytotoxic and genotoxic potential of three concentrations of each 32 of the antiretroviral combinations TDF + 3TC (800 + 400, 1600 + 800, and 3200 + 33 1600 mg/kg body weight, BW) and combivir + EFV (200 + 100 + 400, 400 + 200 + 34 800, and 800 + 400 + 1600 mg/kg BW) after two exposure periods (24 h and 48 h), in 35 the present study the in vivo comet assay (single-cell gel electrophoresis) and the 36 mouse bone marrow micronucleus test were used. Neither TDF + 3TC nor combivir + 37 EFV induced DNA damage at any concentrations tested after 24 h or 48 h using the 38 comet assay. After 24 h, both combinations increased the micronucleus frequency at 39 all concentrations tested. After 48 h, combivir + EFV increased the micronucleated 40 polychromatic erythrocyte (MNPCE) frequency at the two highest concentrations 41 tested. Polychromatic erythrocytes (PCE)/normochromatic erythrocytes (NCE) ratio 42 was high for both combinations, suggesting that they can be mitogenic. Since 43 genotoxicity may be related to carcinogenesis, it is necessary to conduct further 44 studies to verify the long-term mutagenic effects of these drugs. 45

46

47

48 Introduction

The fact that the human immunodeficiency virus (HIV) undergoes several 49 mutations in DNA structure hinders the success of treatments with only one drug. 50 Additionally, in recent years, little progress has been made towards the development 51 of an HIV vaccine, and the maximum efficiency achieved was 31.2%. Thus, the 52 highly active antiretroviral therapy (HAART), a combination of two or more 53 54 antiretroviral drugs, has been used effectively and safely in the management of HIV/AIDS since 1996 [1-4]. 55 Common guidelines for the management of HIV infection (HAART) include the 56 following drug combinations: tenofovir disoproxil fumarate (TDF) plus lamivudine 57 (3TC) and efavirenz (EFV) plus combivir [zidovudine (AZT) + 3TC] [5-8]. However, in 58 studies of each of these drugs individually, some of them presented several side 59 effects. TDF and EFV caused hepatocellular adenomas, carcinomas, and pulmonary 60 alveolar/bronchiolar adenomas in female mice. AZT had clastogenic effects such as 61 sister chromatid exchange and reduction in telomere length. Finally, 3TC exhibited 62 clastogenic effects with micronuclei induction [9-16]. 63 Consequently, these combinations may enhance the genotoxic effects induced by 64 the drugs individually, due to the requirement of lifelong adherence and the unknown 65 effects of long-term treatment. Moreover, the evaluation of the risk/benefit of the 66 drugs should always be performed, because even though many antiretroviral 67

combinations apparently do not present risk to human health due to low levels of

69 toxicity, the cumulative effects of the treatment over decades is still controversial and

not fully understood [4,17–20]. Considering that genotoxicity may be related to

carcinogenesis, it is important to evaluate the genotoxic effects of medicines using
 tests such as the comet assay and the micronucleus test.

The comet assay is useful for detecting DNA damage caused by alkylating,
intercalating, and oxidizing agents. The alkaline version of the test detects DNA
single- and double-strand breaks, alkali-labile sites, and crosslinks, lesions that can
be repaired, since they have not gone through repair mechanisms [21–25].
The micronucleus test detects DNA damage caused by clastogenic and aneugenic
agents by assessing DNA damage at the chromosome level. Micronuclei represent
the genetic material lost by the main core due to the action of physical, chemical, or

⁸⁰ biological agents that caused genetic damage to the chromosome [26–29].

Therefore, the aim of the present study was to assess the cytotoxic and genotoxic potential of the antiretroviral combinations combivir + EFV and TDF + 3TC using the comet assay and the mouse bone marrow micronucleus test [26,30,31].

84

85 Materials and Methods

86 Animals

This study was approved by the Animal Research Ethics Committee of the 87 Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG no. 046/13) and followed the rules of 88 animal management and experimentation of the Colégio Brasileiro de 89 Experimentação Animal [32]. Healthy, young adult outbred male mice (Mus 90 91 musculus, Swiss Webster), weighing 30–40 g, aged 7–12 weeks, obtained from the Central Laboratory of the Universidade Federal de Goiás were brought to the 92 laboratory 7 days prior to the experiment. They were housed in polypropylene cages 93 $(40 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 16 \text{ cm})$, lined with wood shavings, changed daily, with five animals 94

each, at $24 \pm 2^{\circ}$ C, $50 \pm 20\%$ humidity, and a light-dark natural cycle of 12 h. The animals were fed with standard food pellets (appropriate commercial rodent diet Labina, Ecibra Ltda, Santo Amaro, SP, Brazil) and water was provided *ad libitum*.

99 Chemicals

The medicines Viread[®] [300 mg TDF (CAS 202138-50-9) per tablet], 100 Lamivudina[®] [150 mg 3TC (CAS 134678-17-4) per tablet], Estiva-600[®] [600 mg EFV 101 (CAS 154598-52-4) per tablet], and Combivir[®] [300 mg AZT (CAS 30516-87-1) + 150 102 mg 3TC per tablet], kindly donated by the Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar 103 Auad, Goiânia, GO, Brazil, were used in this study. Fetal calf serum (Laborclin, 104 Pinhais, PR, Brazil), Giemsa (Newprov, Pinhais, PR, Brazil), dibasic sodium 105 phosphate, monobasic sodium phosphate, absolute methanol, NaCl (Vetec Química 106 Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brazil), agarose normal melting point, agarose low 107 108 melting point, phosphate buffered saline (PBS), triton X-100, dimethyl sulfoxide (DMSO), stock lysis solution, tris-HCl buffer, ethidium bromide (Genética Brasil, 109 Brasília, DF, Brazil), and cyclophosphamide (CPA, Baxter Hospitalar Ltda., São 110 111 Paulo, SP, Brazil) were used.

112

113 *Protocols* in vivo

Groups of five mice were weighed before administering the chemicals and treated by gavage (forced feeding) with two combinations of antiretroviral drugs, at three different concentrations each, and two exposure periods (24 h and 48 h). On the one hand, 3TC did not present any effects administered intraperitoneally to

rats at the concentration of 200 mg/kg body weight (BW) assessed by the

micronucleus test [33], and therefore we calculated the clinical proportion of the
combination TDF + 3TC (2:1) and doubled this concentration, resulting in the lowest
concentration of 800 + 400 mg/kg BW. The other concentrations were calculated to
be two- and four-fold higher (1600 + 800 and 3200 + 1600 mg/kg BW).

On the other hand, AZT had results at the concentration *o*f 200 mg/kg BW in mice treated intraperitoneally assessed by the micronucleus test [33]. Based on this initial concentration, we calculated the clinical proportion of combivir + EFV (2:1:4),

obtaining the lowest concentration of 200 + 100 + 400 mg/kg BW. The other

127 concentrations were calculated to be two- and four-fold higher (400 + 200 + 800

128 mg/kg BW and 800 + 400 + 1600 mg/kg BW).

129 The tablets were macerated with a mortar and pestle and diluted in distilled water

before administration. Solutions and dilutions were prepared immediately before use.

131 The solvent (distilled water) was used as the negative control, and CPA (50 mg/kg

BW) administered intraperitoneally (ip) was used as the positive control.

All the animals were euthanized by cervical dislocation 24 h or 48 h after

treatment. The femurs were removed, the proximal epiphysis was cut, and the bone

marrow cells from both femurs were flushed with 1 mL fetal calf serum at 37°C. The

supernatant was partially discarded and the precipitate, homogenized with a Pasteur
 pipette, was used for the preparation of slides.

138

139 Comet assay in mice bone marrow

The comet assay was performed using the alkaline method with few modifications
 [21,31]. Slides previously coated with normal melting point agarose (1.5%) received a
 homogenate of 15 µL bone marrow cells diluted in 1 mL PBS buffer (pH 7.0) and 130

143 µL low melting point agarose (0.5%) at 37°C. The material was spread on the slides with coverslips and taken to a cold chamber. After gelation, the coverslips were 144 carefully removed. The slides were immersed in lysis solution protected from light 145 (1% triton X-100, 10% DMSO, 2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, and 10 mM Tris, pH 146 147 10.0) at 4°C for 12–24 h. Subsequently, the slides were incubated with freshly made alkaline solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) at 4°C for 20 min for DNA 148 unwinding. The slides were kept in cuvettes (protected from light) containing a cold 149 lysis solution (triton X-100, DMSO, and stock lysis solution) for 24 h. Electrophoresis 150 was carried out at 25 V, and the current was adjusted to 300 mA, at 4°C. The slides 151 were exposed to this electrical current in the dark for 30 min. After electrophoresis, 152 the slides were placed in a staining tray, covered with a neutralizing buffer (0.4 M tris-153 HCl, pH 7.5), and kept in the dark for 5 min. The slides were stained with 20 µL 154 ethidium bromide solution (0.02 mg/mL) and covered with a coverslip. The analysis 155 was performed using a fluorescence microscopy system, Axioplan-Imaging® (Carl 156 Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Germany), the Integrated Spectrographic 157 Innovative Software (ISIS) with an excitation filter of 510-560 nm, and a barrier filter 158 of 590 nm, 200x magnification, with 50 nucleoids analyzed per slide, totaling 100 159 nucleoids per sample. 160

For the assessment of the genomic damage using the comet assay, the Open
CometTM software, version 1.3 (Cometbio-OpenComet, Singapore) was employed.
The nucleoids with completely fragmented heads were not taken into account in our
analysis. Of the 17 parameters provided by the software, we selected four, as
follows: tail length (TL), percentage of DNA in the tail (%DNA in tail), tail moment
(TM), and Olive tail moment (OTM) [34].

The statistical analysis was performed using the software SigmaStat, version 3.5. The mean and standard deviation (SD) of the four aforementioned parameters of each group treated were considered. The analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test *a posteriori* were carried out comparing the treated groups with their respective control groups. The results were considered statistically significant when *p* < 0.05.

173

174 Micronucleus test

The micronucleus test was performed according to Heddle [26]. After sample 175 homogenization, 20-µL aliquots of bone marrow cells prepared as described above 176 were smeared on glass slides, coded for blind analysis, air-dried, and fixed with 177 absolute methanol at room temperature for 5 min. The smears were stained with 178 Giemsa, dibasic sodium phosphate, and monobasic sodium phosphate, and buffered 179 180 at pH 6.8 for 15 min. After this period, the slides were washed, dried at room temperature, and analyzed in an optical microscope (Olympus BH-2 10x100, Tokyo, 181 Japan), 1000x magnification. 182

183 For each animal, two slides were prepared for each concentration of the

combinations and 1000 polychromatic erythrocytes (PCE) were counted in each

185 slide, totaling 2000 PCE, to determine the frequency of micronucleated polychromatic

186 erythrocytes (MNPCE) using light microscopy (Olympus BH-2 10 × 100, Tokyo,

187 Japan). Simultaneously, the frequency of normochromatic erythrocytes (NCE) was

determined and the PCE/NCE ratio was calculated, allowing inferences about the

189 cytotoxic potential of the drugs tested.

190 The statistical analysis was carried out using the software SigmaStat, version 3.5. The frequencies of PCE/NCE ratio were compared with the negative control groups 191 using the chi-square test. To compare the cytotoxicity at the two exposure periods, 192 the chi-square test was applied. The frequency of micronuclei per 2000 PCE for each 193 194 concentration was compared with the negative control group using ANOVA, to infer whether clastogenicity and/or aneugenicity induced by the drugs tested were present. 195 To compare the genotoxicity at the two exposure periods, the Student-t test was 196 performed for each concentration. The results were considered statistically significant 197 when p < 0.05. 198

199

200 **Results**

All the animals survived the treatments and no clinical signs of toxicity were observed in any treated groups. The frequencies of genomic damage in mice bone marrow and controls are shown in Table 1. Based on the four parameters assessed using the comet assay, neither of the combinations tested significantly induced DNA damage at the exposure periods (24 h and 48 h) compared with their respective negative controls.

The results obtained for the micronucleus test are presented in Table 2, including 207 the mean MNPCE per 2000 PCE for genotoxicity and the mean PCE/NCE ratio for 208 cytotoxicity. At 24 h, combivir + EFV significantly increased MNPCE frequency, 209 demonstrating its genotoxic potential, and increased the PCE/NCE ratio at all tested 210 concentrations. Compared with the negative control, this combination of drugs 211 212 showed absence of cytotoxic effect, since cytotoxicity is proven by a decrease in the PCE/NCE ratio. At 48 h of exposure and compared with the negative control, this 213 combination significantly increased MNPCE frequency at the two highest 214

concentrations and increased the PCE/NCE ratio at all concentrations tested,
indicating that this combination is non-cytotoxic and exhibited mitogenic potential.
Compared with the exposure period of 24 h, at 48 h of exposure, combivir + EFV
significantly reduced MNPCE frequency and significantly increased the PCE/NCE
ratio at all concentrations tested.

At 24 h, TDF + 3TC significantly increased the frequency of MNPCE and the 220 PCE/NCE ratio compared with the negative control, displaying genotoxic effects and 221 non-cytotoxic effects, respectively. At 48 h, the use of this combination of drugs did 222 not lead to significant differences in MNPCE frequency at any tested concentrations 223 compared with the negative control, demonstrating absence of genotoxicity. 224 Additionally, at the same exposure period, this combination caused significant 225 increase in the PCE/NCE ratio at all concentrations tested compared with the 226 negative control, showing no cytotoxicity. Compared with the exposure period of 24 227 h, at 48 h, this combination significantly reduced MNPCE frequency at all 228 concentrations tested and significantly increased the PCE/NCE ratio at the two 229 lowest concentrations. No changes were observed in the PCE/NCE ratio at the 230 231 highest concentration tested compared with the exposure period of 24 h.

232

233 Discussion

The aim of this study was to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of two antiretroviral combinations (TDF + 3TC and combivir + EFV) using the comet assay and the micronucleus test.

Neither of the combinations tested exhibited genotoxicity in the comet assay, but
 both displayed genotoxicity in the micronucleus test at 24 h. In the micronucleus test,

DNA damage occurred at chromosomal level, suggesting that drug combinations can
induce clastogenic and aneugenic effects. Furthermore, the PCE/NCE ratio was high
for both combinations of drugs, suggesting that they can be mitogenic.

EFV, one of the components of the combination combivir + EFV, presents 242 selective cytotoxic effects on various tumor cells, leading to phosphorylation and 243 244 activation of the p53 tumor suppressor protein. Therefore, it has antitumorigenic and cytostatic potential [35]. This cytotoxic selectivity for tumor cells, or even the 245 interaction of the drugs in the combination combivir + EFV, may have been 246 responsible for the absence of cytotoxic effects observed in this study, inasmuch as 247 our tests were performed in non-tumorous cells. This finding is corroborated by the 248 fact that EFV alone was not cytotoxic to human adipose tissue at low concentrations 249 (0.5 and 4 µM) [36]. 250

In our study, combivir (*AZT* + *3TC*) in combination with EFV displayed mitosisinducing effects since it increased PCE, thus not exhibiting cytotoxicity. However, the antiretroviral drugs AZT and 3TC administered isolatedly have previously been shown to be cytotoxic to CrFK cells [37]. Therefore, we suggest that the interaction of these drugs may reduce their cytotoxic effects.

In relation to genotoxicity, at the concentration of 400 mg/kg BW, AZT caused 256 genotoxic effects on the peripheral blood lymphocytes and on liver and kidney cells 257 assessed using the comet assay and induced micronuclei in bone marrow cells [34]. 258 Also, AZT was genotoxic to human H9 lymphoblastoid cells in a dose-dependent 259 manner at the concentrations of 0.05, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.2 mM. These findings 260 suggest that DNA damage was caused by alkali-labile lesions and not by double-261 strand breaks, because the genomic damage occurred only at pH 13.0, and not at pH 262 12.1 or 8.0 [38]. In another study, AZT was genotoxic and 3TC was not genotoxic 263

when administered to neonatal mice. Finally, the combination AZT + 3TC did not alter
the responses observed with AZT alone [33].

Increased damage indexes and frequencies were observed in the brain of mice
 subchronically treated with 10 mg/kg BW EFV. This finding suggests that this drug
 might induce genotoxicity in the brain [39].

In our study, the combination combivir + EFV had genotoxic effects at

chromosomal level (clastogenicity and/or aneugenicity) at both exposure periods.

AZT caused chromosomal aberrations in culture cells of patients that received 1200

mg/day [40], therefore, this drug alone may have contributed to the genotoxicity

found in our study. Another possibility is that combivir is responsible for the

274 genotoxicity, since AZT and combivir caused a decrease in the percentage of

275 reticulocytes (RETs) and an increase in the percentage of micronucleated RETs and

micronucleated normochromatic erythrocytes in neonatal mice [41].

277 The combination TDF + 3TC did not induce DNA damage assessed using the 278 comet assay, not causing cytotoxicity in either exposure period, but increased MNPCE frequency at 24 h assessed using the micronucleus test. The induction of 279 mitosis in PCE caused by this combination of drugs, observed by the increase in the 280 PCE/NCE ratio, can be due to the action of 3TC. HepG2 cells treated with 3TC, AZT, 281 and abacavir (ABC) showed slight increases in mitochondrial DNA compared with the 282 control group. On the other hand, TDF had no effect on mitochondrial DNA content in 283 this cell line [42]. Given that 3TC interferes with mitochondrial DNA replication, we 284 suggest that this drug could contribute to cell proliferation, inducing mitosis. In a 285 study that assessed the cytotoxicity profile of TDF on various cell types, this 286 antiretroviral drug exhibited the lowest cytotoxic effects on all cell types tested 287

compared to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) [43]. This 288 absence of cytotoxicity was confirmed in our study even in combination with 3TC. 289 290 TDF alone showed no genotoxicity assessed by the Ames test, the chromosomal aberration test using Chinese hamster lung (CHL), and the micronucleus assay [44]. 291 However, AZT and 3TC individually tested showed induction of micronuclei in 292 293 cultured human lymphocytes in binucleated cells using the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay [13,14]. In the present study, TDF + 3TC exhibited 294 clastogenic and/or aneugenic effects on MNPCE induction. 295 Comparing both exposure periods, combivir + EFV and TDF + 3TC increased the 296 PCE/NCE ratio respectively at all concentrations tested and at the two lowest 297 concentrations. At 48 h, combivir + EFV and TDF + 3TC caused decrease in the NCE 298 frequency respectively at all concentrations tested and at the two lowest 299 concentrations. In contrast, MNPCE induction significantly decreased at 48 h at all 300 concentrations tested of both combinations. This decrease may be related to the half-301 302 life of the compounds, a parameter that is low in relation to the exposure time: 5–9 h for AZT triphosphate and 11-33 h for 3TC triphosphate [45]. For patients with 303 CYP2B6 516 GG, GT, and TT genotypes, EFV half-lives were 23, 27, and 48 h, 304 305 respectively [46]. After the administration of 300 to 600 mg TDF to human cohorts, the drug concentrations in the serum decreased rapidly with half-lives between 12 h 306 to 15 h [47]. The elimination of micronucleated cells can occur as a consequence of 307 apoptosis [48–50], which justifies the decrease in MNPCE frequency observed at 48 308 h. A selective elimination of MNPCE in peripheral blood was found [51], and we 309 suggest that the same mechanism may have occurred in the bone marrow. 310 In the comet assay neither combination induced DNA damage at all tested 311

312 concentrations at both exposure periods (24 h and 48 h), whereas in the

313	mie	cronucleus test combivir + EFV induced higher MNPCE frequency than TDF + 3TC
314	ata	all tested concentrations at both exposure periods. In contrast, the PCE/NCE ratio
315	wa	s higher with the combination TDF + 3TC, indicating greater mitogenic potential at
316	bo	th exposure periods.
317		Genotoxicity may be related to carcinogenesis and both combinations of drugs
318	tes	ted demonstrated that they are capable of inducing clastogenic and/or aneugenic
319	eff	ects. However, further long-term studies are necessary to evaluate the possible
320	sid	e effects of the different combinations of drugs administered in the lifelong
321	an	tiretroviral therapy of HIV-infected patients.
322		
323	Ac	knowledgements
324		This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de
325	Pe	ssoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do
326	Es	tado de Goiás (FAPEG). The authors acknowledge the Hospital de Doenças
327	Tro	ppicais Dr. Anuar Auad for the donation of the medicines.
328		
329	Re	ferences
330	1.	Duan C, Poticha D, Stoeckli TC, Petropoulos CJ, Whitcomb JM, McHenry CS, et
331		al. Inhibition of purified recombinant reverse transcriptase from wild-type and
332		zidovudine-resistant clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by
333		zidovudine, stavudine, and lamivudine triphosphates. J Infect Dis. 2001; 184:
334		1336–1340. doi: 10.1086/323995
335	2.	Enteshami M, Scarth BJ, Tchesnokov EP, Dash C, Le Grice SFJ, Hallenberger

336 S, et al. Mutations M184V and Y115F in HIV-1 reverse transcriptase discriminate

- against "nucleotide-competing reverse transcriptase inhibitors". J Biol Chem.
- 338 2008; 283: 29904–29911. doi: 10.1074/jbc.M804882200
- **3**39 **3.** Walker DM, Kajon AE, Torres SM, Carter MM, McCash CL, Swenberg JA, et al.
- 340 WR1065 mitigates AZT-ddl-induced mutagenesis and inhibits viral replication.
- 341 Environ Mol Mutagen. 2009; 50: 460–472. doi: 10.1002/em.20482
- **4.** Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R,
- et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in
- Thailand. N Engl J Med. 2009; 361: 2209–2220. doi: 10.1056/NEJMoa0908492
- **5.** Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, Pozniak AL, Gazzard B, Campo RE, et al.
- 346 Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and
- efavirenz for HIV. N Engl J Med. 2006; 354: 251–260. doi:
- 348 10.1056/NEJMoa051871
- 349 **6.** Pozniak AL, Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, Gazzard B, Campo RE, et al.
- 350 Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz versus fixed-dose
- zidovudine/lamivudine and efavirenz in antiretroviral-naive patients: virologic,
- immunologic, and morphologic changes—A 96-week analysis. J Acquir Immune
- 353 Defic Syndr. 2006; 43: 535–540. doi: 10.1097/01.qai.0000245886.51262.67
- **7.** Herd O, Francies F, Slabbert J, Baeyens A. The effect of HIV and antiretroviral
- therapy on chromosomal radiosensitivity. J AIDS Clin Res. 2014; 5: 397. doi:
- **10.4172/2155-6113.1000397**
- **8.** Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the
- use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents.
- 359 Washington, DC: Department of Health and Human Services; 2016. Available:
- 360 https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf

361	9.	Schilling BE, Nelson DR, Proctor JE, Diamond SS, Kaul S, Hawkins HC. The
362		nonclinical toxicologic profile of stavudine. Curr Ther Res. 1995; 56: 201–218.
363		doi: 10.1016/0011-393X(95)85025-2
364	10.	Bialkowska A, Bialkowski K, Gerschenson M, Diwan BA, Jones AB, Olivero OA,
365		et al. Oxidative DNA damage in fetal tissues after transplacental exposure to 3'-
366		azido-3'-deoxythymidine (AZT). Carcinogenesis. 2000; 21: 1059–1062. doi:
367		10.1093/carcin/21.5.1059
368	11.	Bishop JB, Witt KL, Tice RR, Wolfe GW. Genetic damage detected in CD-1
369		mouse pups exposed perinatally to 3'-azido-3'-deoxythymidine and
370		dideoxyinosine via maternal dosing, nursing, and direct gavage. Environ Mol
371		Mutagen. 2004; 43: 3–9. doi: 10.1002/em.10210
372	12.	Carter MM, Torres SM, Cook Jr. DL, McCash CL, Yu M, Walker VE, et al.
373		Relative mutagenic potencies of several nucleoside analogs, alone or in drug
374		pairs, at the HPRT and TK loci of human TK6 lymphoblastoid cells. Environ Mol
375		Mutagen. 2007; 48: 239–247. doi: 10.1002/em.20282
376	13.	Bayram S, Topaktaş M. Confirmation of the chromosome damaging effects of
377		lamivudine in in vitro human peripheral blood lymphocytes. Environ Mol Mutagen.
378		2008; 49: 328–333. doi: 10.1002/em.20393
379	14.	Lourenço ED, Amaral VS, Lehmann M, Dihl RR, Schmitt VM, Cunha KS, et al.
380		Micronuclei induced by reverse transcriptase inhibitors in mononucleated and
381		binucleated cells as assessed by the cytokinesis-block micronucleus assay.
382		Genet Mol Biol. 2010; 33: 756–760. doi: 10.1590/S1415-47572010005000084
383	15.	Friedrich A, Olejniczak K. Evaluation of carcinogenicity studies of medicinal
384		products for human use authorised via the European centralised procedure

- 385 (1995–2009). Regul Toxicol Pharm. 2011; 60: 225–248. doi:
- 386 10.1016/j.yrtph.2011.04.001
- **16.** Wu KM, Powley MW, Ghantous H. Timing of carcinogenicity studies and
- 388 predictability of genotoxicity for tumorigenicity in anti-HIV drug development. Int J
- 389 Toxicol. 2012; 31: 211–221. doi: 10.1177/1091581812439585
- **17.** Brambilla G, Mattioli F, Robbiano L, Martelli A. Studies on genotoxicity and
- 391 carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs.
- 392 Mutagenesis. 2011; 1–27. doi: 10.1093/mutage/ger094
- **18.** Brambilla G, Mattioli F, Robbiano L, Martelli A. Update of carcinogenicity studies
- in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals. Mutat Res Rev Mutat
- 395 Res. 2012; 750: 1–51. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.09.002
- **19.** Guimarães NN, Silva CJ, Andrade HHR, Dihl RR, Lehmann M, Cunha KS.
- 397 Comparative analysis of genetic toxicity of antiretroviral combinations in somatic
- cells of *Drosophila melanogaster*. Food Chem Toxicol. 2013; 53: 299–309. doi:
- 399 10.1016/j.fct.2012.12.005
- 400 **20.** Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ.
- 401 The challenge of finding a cure for HIV infection. Science. 2009; 323: 1304–
- 402 1307. doi: 10.1126/science.1165706
- 403 **21.** Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for
- 404 quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1998;
- 405 175: 184–191. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0
- 406 **22.** Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L.
- 407 Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity
- investigations. Mutagenesis. 2004; 19: 51–59. doi: 10.1093/mutage/geg038

409 **23.** Goldschalk RWL, Ersson C, Riso P, Porrini M, Langie SAS, van Schooten FJ, et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: An inter-410 laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group 411 (ECVAG). Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutag. 2013; 757: 60-67. doi: 412 10.1016/j.mrgentox.2013.06.020 413 24. Guanggang X, Diqiu L, Jianzhong Y, Jingmin G, Huifeng Z, Mingan S, et al. 414 Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage 415 induction. Food Chem Toxicol. 2013; 53: 352–358. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.020 416 25. Collins A, Koppen G, Valdiglesias V, Dusinska M, Kruszewski M, Møller P, et al. 417 The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet 418 Project. Mutat Res Rev Mutat Res. 2014; 759: 27-39. doi: 419 10.1016/j.mrrev.2013.10.001 420 26. Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat Res Fundam Mol 421 Mech Mutagen. 1973; 18: 187–190. doi: 10.1016/0027-5107(73)90035-3 422 27. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, et al. Guidelines for 423 the conduct of micronucleus assays in mammalian bone erythrocytes. Mutat Res 424 Genet Toxicol. 1987; 189: 103-112. doi: 10.1016/0165-1218(87)90016-4 425 **28.** Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, et 426 al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutat Res Environ Mutagen 427 Relat Subj. 1994; 312: 293–304. doi: 10.1016/0165-1161(94)90039-6 428 29. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and 429 data interpretation. Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen. 2000; 455: 155–166. 430 doi: 10.1016/S0027-5107(00)00117-2 431

- **30.** Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet
- 433 assay. Biochim Biophys Acta. 2014; 1840: 794–800. doi:
- 434 10.1016/j.bbagen.2013.04.022
- 435 **31.** Attia SM, Ahmad SF, Zoheir KM, Bakheet SA, Helal GK, Abd-Allah AR, et al.
- 436 Genotoxic evaluation of chloroacetonitrile in murine marrow cells and effects on
- 437 DNA damage repair gene expressions. Mutagenesis. 2014; 29: 55–62. doi:
- 438 10.1093/mutage/get063
- 439 **32.** COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. São Paulo: Colégio
- 440 Brasileiro de Experimentação Animal; 1991. Available:
- 441 http://www2.fcfar.unesp.br/Home/ComitedeEtica/principios%20eticos%20na%20
- 442 experimentacao%20animal%20cobea.pdf
- **33.** Von Tungeln LS, Hamilton LP, Dobrovolsky VN, Bishop ME, Shaddock JG,
- 444 Heflich RH, et al. Frequency of *Tk* and *Hprt* lymphocyte mutants and bone
- 445 marrow micronuclei in $B6C_3F_1/Tk_+/-$ mice treated neonatally with zidovudine and
- 446 lamivudine. Carcinogenesis. 2002; 23: 1427–1432. doi: 10.1093/carcin/23.9.1427
- 447 **34.** Tripathi DN, Pawar AA, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Use of the alkaline
- 448 comet assay for the detection of transplacental genotoxins in newborn mice.
- 449 Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2008; 653: 134–139. doi:
- 450 10.1016/j.mrgentox.2008.03.004
- **35.** Hecht M, Harrer T, Büttner M, Schwegler M, Erber S, Fietkau R, et al. Cytotoxic
- 452 effect of efavirenz is selective against cancer cells and associated with the
- 453 cannabinoid system. AIDS. 2013; 27: 2031–2040. doi:
- 454 10.1097/QAD.0b013e3283625444
- 455 **36.** Díaz-Delfín J, Gutiérrez MM, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, Mateo MG,
- 456 Villarroya F, et al. Effects of nevirapine and efavirenz on human adipocyte

- 457 differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. Antivir
- 458 Res. 2011; 91: 112–119. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.04.018
- 459 **37.** Bisset LR, Lutz H, Böni J, Hofmman-Lehmann R, Lüthy R, Schüpback J.
- 460 Combined effect of zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and abacavir (ABC)
- 461 antiretroviral therapy in suppressing in vitro FIV replication. Antivir Res. 2002; 53:
- 462 **35–45.** doi: 10.1016/S0166-3542(01)00190-5
- 463 **38.** Escobar PA, Olivero OA, Wade NA, Abrams EJ, Nesel CJ, Ness RB, et al.
- Genotoxicity assessed by the comet and *GPA* assays following in vitro exposure
- of human lymphoblastoid cells (H9) or perinatal exposure of mother–child pairs to
- 466 AZT or AZT-3TC. Environ Mol Mutagen. 2007; 48: 330–343. doi:
- 467 **10.1002/em.20285**
- **39.** Oliveira HM, Damiani AP, Dias RO, Romão PRT, Andrade VM. Effect of
- antiretroviral drugs on the DNA damage in mice. Environ Toxicol Pharmacol.

470 2014; 37: 390–395. doi: 10.1016/j.etap.2013.12.011

- 471 **40.** Shafik HM, Nokta MA, Pollard RB. Recombinant human interferon beta ser
- 472 protects against zidovudine-induced genetic damage in AIDS patients. Antivir
- 473 Res. 1991; 16: 205–212. doi: 10.1016/0166-3542(91)90026-N

474 **41.** Von Tungeln LS, Williams LD, Doerge DR, Shaddock JG, McGarrity LJ, Morris

475 SM, et al. Transplacental drug transfer and frequency of *Tk* and *Hprt* lymphocyte

- 476 mutants and peripheral blood micronuclei in mice treated transplacentally with
- zidovudine and lamivudine. Environ Mol Mutagen. 2007; 48: 258–269. doi:
- 478 10.1002/em.20237

479 **42.** Baar MP, Rooij ER, Smolders KGM, van Schijndel HB, Timmermmans EC,

480 Bethell R. Effects of apricitabine and other nucleoside reverse transcriptase

- inhibitors on replication of mitochondrial DNA in HepG2 cells. Antivir Res. 2007;
- 482 76: 68–74. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.05.004
- 483 **43.** Cihlar T, Birkus G, Greenwalt DE, Hitchcock MJM. Tenofovir exhibits low
- 484 cytotoxicity in various human cell types: comparison with other nucleoside
- reverse transcriptase inhibitors. Antivir Res. 2002; 54: 37–45. doi:
- 486 10.1016/S0166-3542(01)00210-8
- 487 **44.** Lei FX, Lei J, Wei JJ, Mao L. Genetictoxicity of tenofovir dipivoxil fumarate. Chin
- 488 J Antibiot. 2011–12. Available: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-
- 489 ZKSS201112018.htm
- 490 **45.** Anderson PL, Kakuda TM, Kawle S, Fletcher CV. Antiviral dynamics and sex
- 491 differences of zidovudine and lamivudine triphosphate concentrations in HIV-
- 492 infected individuals. AIDS. 2003; 17: 2159–2168. doi:
- 493 10.1097/01.aids.0000076338.42412.62
- 494 **46.** Ribaudo HJ, Haas DW, Tierney C, Kim RB, Wilkinson GR, Gulick RM, et al.
- 495 Pharmacogenetics of plasma efavirenz exposure after treatment discontinuation:
- 496 an adult AIDS clinical trials group study. *Clin Infect Dis. 2006;* 42: 401–407. doi:
- 497 10.1086/499364
- 498 **47.** Barditch-Corvo P, Deeks SG, Collier A, Safrin S, Coakley DF, Miller M, et al.
- 499 Phase I/II trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of
- 500 tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults.
- 501 Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 2733–2739. doi:
- 502 10.1128/AAC.45.10.2733-2739.2001
- 48. Decordier I, Dillen L, Cundari E, Kirsch-Volders M. Elimination of micronucleated
- cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. Mutagenesis.
- 505 2002; 17: 337–344. doi: 10.1093/mutage/17.4.337

49. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An
increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the
risk of cancer in humans. Carcinogenesis. 2006; 28: 625–631. doi:
10.1093/carcin/bgl17
50. Decordier I, Cundari E, Kirsch-Volders M. Survival of aneuploid, micronucleated
and/or polyploid cells: Crosstalk between ploidy control and apoptosis. Mutat Res
Genet Toxicol Environ Mutagen. 2008; 651: 30–39. doi:
10.1016/j.mrgentox.2007.10.016
51. Schlegel R, MacGregor JT. The persistence of micronucleated erythrocytes in
the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats:
Implications for cytogenetic screening. Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen.

1984; 127: 169–174. doi: 10.1016/0027-5107(84)90018-6

518 Table 1. Comet assay analysis in bone marrow cells of mice treated with two antiretroviral combinations and their

respective controls.

Treatment		Comet assay param	neters ¹ (mean ± SD)	
-	TL	% DNA in tail	ТМ	ОТМ
Combivir + EFV				
24 h				
Negative control ²	9.45 ± 1.98	24.77 ± 5.87	7.72 ± 1.68	4.75 ± 1.01
Positive control ³	26.44 ± 3.80	74.54 ± 10.77	25.05 ± 3.81	12.96 ± 1.81
200 + 100 + 400 mg/kg	12.25 ± 4.90 ^a	23.76 ± 5.29 ^a	9.56 ± 3.11 ^a	5.97 ± 2.01 ^a
400 + 200 + 800 mg/kg	12.42 ± 5.74 ^a	23.42 ± 7.24 ^a	9.67 ± 4.04^{a}	6.10 ± 2.45^{a}
800 + 400 + 1600 mg/kg	10.48 ± 3.23 ^a	22.19 ± 2.82 ^a	8.60 ± 2.66 ^a	5.45 ± 1.67^{a}
48 h				
Negative control	9.45 ± 1.98	24.77 ± 5.87	7.72 ± 1.68	4.75 ± 1.01

Positive control	16.48 ± 3.53	26.09 ± 0.40	10.94 ± 1.44	7.06 ± 0.82
200 + 100 + 400 mg/kg	9.95 ± 3.56 ^a	18.47 ± 7.85 ^a	7.16 ± 3.90^{a}	4.79 ± 2.31ª
400 + 200 + 800 mg/kg	12.05 ± 2.86 ^a	25.16 ± 3.61ª	9.60 ± 2.61 ^a	6.15 ± 1.57ª
800 + 400 + 1600 mg/kg	12.26 ± 1.99ª	25.66 ± 7.73 ^a	9.54 ± 2.44 ^a	6.00 ± 1.27^{a}
TDF + 3TC				

24 h

Negative control	9.45 ± 1.98	24.77 ± 5.87	7.72 ± 1.68	4.75 ± 1.01
Positive control	26.44 ± 3.80	74.54 ± 10.77	25.05 ± 3.81	12.96 ± 1.81
800 + 400 mg/kg	10.67 ± 3.24ª	23.03 ± 6.86^{a}	8.30 ± 3.26 ^a	5.51 ± 1.92ª
1600 + 800 mg/kg	9.79 ± 2.87 ^a	21.07 ± 8.33 ^a	7.77 ± 2.97 ^a	4.77 ± 1.50 ^a
3200 + 1600 mg/kg	10.15 ± 1.32ª	24.23 ± 4.79^{a}	7.95 ± 1.20^{a}	5.05 ± 0.58^{a}
48 h				
Negative control	9.45 ± 1.98	24.77 ± 5.87	7.72 ± 1.68	4.75 ± 1.01

Positive control	16.48 ± 3.53	26.09 ± 0.40	10.94 ± 1.44	7.06 ± 0.82
800 + 400 mg/kg	12.91 ± 3.59ª	30.53 ± 7.46^{a}	11.21 ± 3.10ª	6.63 ± 1.84^{a}
1600 + 800 mg/kg	14.06 ± 5.44ª	26.65 ± 13.21ª	11.42 ± 4.92ª	6.98 ± 2.60 ^a
3200 + 1600 mg/kg	6.74 ± 1.15ª	16.64 ± 2.95 ^a	5.30 ± 1.08 ^a	3.38 ± 0.65^{a}

⁵²⁰ ¹ TL, tail length; %DNA in tail, percentage of DNA in the tail; TM, tail moment; OTM, Olive tail moment.

- 521 ² Negative control: distilled water.
- ³ Positive control: cyclophosphamide (50 mg/kg BW).
- 523 All the results were compared with their respective control group at the respective exposure period.
- ^a No statistically significant difference compared with the negative control group (p > 0.05).

Table 2. Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes(MNPCE) and polychromatic and normochromatic erythrocyte (PCE/NCE)ratio in bone marrow of mice treated with two antiretroviral combinationsand their respective controls.

Treatment	MNPCE/2000 PCE	PCE/NCE
	(mean ±SD)	(mean ±SD)
Combivir + EFV		
24 h		
Negative control ¹	3.20 ± 0.84	1.27 ± 0.08
Positive control ²	27.20 ± 1.30	0.71 ± 0.02
200 + 100 + 400 mg/kg	11.00 ± 1.58 ^b	2.17 ± 0.66^{b}
400 + 200 + 800 mg/kg	11.60 ± 2.51 ^b	1.66 ± 0.16^{b}
800 + 400 + 1600 mg/kg	9.80 ± 2.77^{b}	1.71 ± 0.19 ^b
48 h		
Negative control	3.20 ± 0.84	1.27 ± 0.08
Positive control	22.00 ± 1.41	0.78 ± 0.03
200 + 100 + 400 mg/kg	$5.60 \pm 1.34^{a,d}$	$3.24 \pm 0.63^{b,d}$
400 + 200 + 800 mg/kg	$6.20 \pm 1.48^{b,d}$	$2.84 \pm 0.55^{b,d}$
800 + 400 + 1600 mg/kg	$6.00 \pm 1.58^{b,d}$	$2.99 \pm 0.76^{b,d}$
TDF + 3TC		

24 h

Negative control	3.20 ± 0.84	1.27 ± 0.08
Positive control	27.20 ± 1.30	0.71 ± 0.02
800 + 400 mg/kg	9.20 ± 1.3^{b}	2.83 ± 0.55^{b}
1600 + 800 mg/kg	8.00 ± 1.22^{b}	2.67 ± 0.15 ^b
3200 + 1600 mg/kg	8.60 ± 1.34^{b}	3.30 ± 0.34^{b}
10 h		
40 11		
Negative control	3.20 ± 0.84	1.27 ± 0.08
Negative control Positive control	3.20 ± 0.84 22.00 ± 1.41	1.27 ± 0.08 0.78 ± 0.03
Negative control Positive control 800 + 400 mg/kg	3.20 ± 0.84 22.00 ± 1.41 $4.20 \pm 0.45^{a,d}$	1.27 ± 0.08 0.78 ± 0.03 $3.23 \pm 0.34^{b,d}$
Negative control Positive control 800 + 400 mg/kg 1600 + 800 mg/kg	3.20 ± 0.84 22.00 ± 1.41 $4.20 \pm 0.45^{a,d}$ $3.80 \pm 0.84^{a,d}$	1.27 ± 0.08 0.78 ± 0.03 $3.23 \pm 0.34^{b,d}$ $3.14 \pm 0.54^{b,d}$

¹ Negative control: distilled water.

² Positive control: cyclophosphamide (50 mg/kg BW).

All the results were compared with their respective control group at the respective exposure period.

^a No statistically significant difference compared with the negative control group

(p > 0.05).

^b Statistically significant difference compared with the negative control group (p < 0.05).

^c No statistically significant difference compared with the same concentration at 24 h (p > 0.05).

^d Statistically significant difference compared with the same concentration at 24

h (*p* < 0.05).

COMPROVANTE DE ACEITE DO ARTIGO - REVISTA PLOS ONE (FATOR DE IMPACTO: 3.54)

Publication Date Notification: (pone.0165706) Genotoxic and Cytotoxic Effects of Antiretroviral Combinations in Mice Bone Marrow
Entrada ×



Dear Author,

We're pleased to announce that your manuscript "Genotoxic and Cytotoxic Effects of Antiretroviral Combinations in Mice Bone Marrow" has a scheduled publication date of Nov 02, 2016. Your article will remain under a strict press embargo until 2 PM Eastern Time (US) on the date of publication.

Please note that publication dates may change; this is not a frequent occurrence, but can happen due to unforeseen technical issues. If you are planning a press release, and have *not* already coordinated the publication date with the journal, please contact them as soon as possible.

PLOS routinely tracks the media coverage our articles receive; however, we aren't always able to capture all of it. Therefore, if you discover or produce news content about your article that you would like to be added, please let us know. To submit a media link, fill out the online form found on the Related Content tab of your paper. The coverage you submit will be posted pending staff approval.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

Os testes que usaram a *D. melanogaster* como organismo experimental, SMART e Ensaio Cometa, nos permitiram avaliar a genotoxicidade dos medicamentos antirretrovirais isolados (EFV, Combivir, TDF e 3TC) e em combinação (Combivir+EFV e TDF+3TC). O SMART permite avaliar simultaneamente dois processos que estão comprovadamente relacionados com a carcinogênese: as mutações e a recombinação homóloga (Graf et al., 1984; Andrade et al., 2003; Bishop e Schiestl, 2003; Andrade e Lehmann, 2004).

Além disso, a enzima desoxirribonucleosídeo quinase (Dm-dNK) de *D. melanogaster*, que fosforila os quatro desoxirribonucleosídeos naturais, apresenta similaridades com enzimas de células de mamíferos. O nível mais elevado de semelhança no sequenciamento, foi com a enzima mitocondrial humana timidina quinase 2 com a qual compartilha alguns substratos (Munch-Petersen et al., 1998; Johansson et al., 1999; Solaroli et al., 2003).

O Ensaio Cometa é um dos testes mais utilizados para avaliação de genotoxicidade e reparo do DNA, uma vez que pode ser empregado em quase todos os tipos de células de diversos organismos, incluindo a *D. melanogaster*. Esse teste pode detectar níveis baixos de diferentes tipos de danos celulares incluindo quebra simples de DNA e sítios alcalilábeis (Hartmann et al., 2004; Dhawan et al., 2009; Carmona et al., 2011a; Carmona et al., 2011b; Brennan et al., 2012; Godschalk et al., 2013; Guanggang et al., 2013; Collins et al., 2014; Gaivão e Sierra, 2014).

Na avaliação dos efeitos mutagênicos e recombinogênicos do EFV, os resultados demonstraram que esse medicamento foi tóxico nas maiores concentrações testadas (12,5; 25 e 50 mg/mL) e não apresentou indução de eventos mutagênicos e/ou recombinogênicos. Nossos resultados de toxicidade corroboram com o estudo de Díaz e Delfín (2011) que verificaram que, em baixas concentrações (0,5 e 4 μ M), o EFV não foi significativamente citotóxico, mas na concentração de 20 μ M causou morte celular extensa em cultura de células de adipócitos humanos. Adicionalmente, os resultados de Adjene e Igbigbi (2010) sugeriram que a administração do EFV por tempo prolongado apresentou efeitos tóxicos sobre células do colículo inferior de ratos Wistar observado por meio da diminuição das células que pode ser consequência de morte celular induzida pelo fármaco.

Apesar de baixos índices de toxicidade de muitos regimes antirretrovirais, o acúmulo de efeitos ao longo de décadas de tratamento é controverso e não devidamente comprovado (Richman et al., 2009).

Bumpus (2011) incubou hepatócitos humanos com EFV e 8-hidroxiefavirenz (8-OHEFV), principal metabólito do EFV. Os resultados mostraram morte celular, ativação de caspases-3, formação de espécies reativas de oxigênio, estimulação da fosforilação da via de sinalização JNK e estimulação da expressão da isoforma proapoptótica da proteína Bim (bcl-2, mediador de morte celular). Os dados sugeriram que o metabólito oxidativo 8-OHEFV é um indutor mais potente da morte celular hepática do que o composto original do EFV. Também, em nosso estudo, o EFV induziu efeitos tóxicos somente na maior concentração testada e não mostrou efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos quando testado em linhagens que apresentam alto nível de enzimas de metabolização.

Estudos de revisão sobre genotoxicidade e carcinogenicidade de diversos medicamentos de uso frequente e de longa duração mostram que o EFV não apresenta efeitos genotóxicos em testes *in vitro* e *in vivo* efetuados com diversos organismos e células, tais como *Salmonella typhimurium, Escherichia coli*, células do ovário de hamster chinês e camundongos (Brambilla et al., 2011; Wu et al. 2012). A ausência de efeitos mutagênicos e recombinogênicos do EFV foi confirmada em nossos resultados com o SMART. No entanto, o EFV mostrou efeitos genotóxicos no Ensaio Cometa em *D. melanogaster*. Dessa maneira, sugere-se que o mecanismo de reparo possa estar atuando nos danos causados pelo EFV no DNA e, portanto, não foram possíveis de serem detectados por ensaios que avaliam lesões fixadas.

Em relação ao Combivir, nossos dados corroboram um estudo realizado em nosso laboratório com AZT, 3TC e AZT+3TC no qual os resultados não apresentaram efeitos tóxicos, mas mostraram efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos em concentrações equivalentes às testadas em nosso estudo (Guimarães et al., 2013). Nossos dados mostraram que a combinação Combivir+EFV reduziu os efeitos genotóxicos induzidos pelo Combivir tanto no Ensaio Cometa como no SMART. Assim, podemos concluir que, quando combinados, Combivir e EFV são antagônicos para indução de efeitos genotóxicos.

Em relação ao TDF, nosso trabalho demonstrou ausência de toxicidade e indução de eventos genotóxicos em todas as concentrações de TDF testadas. Segundo Brambilla et al. (2011), apesar de não apresentar genotoxicidade em *S. typhimurium* e

camundongos, o TDF foi genotóxico em linhagem celular L5178Y de linfoma de camundongos. O estudo de revisão realizado por Wu et al. (2012) descreve a ação genotóxica do TDF e cultura de células, confirmando assim, os resultados encontrados neste trabalho com *D. melanogaster*.

Brambilla et al. (2012) realizaram uma revisão sobre carcinogenicidade de medicamentos e verificaram que o EFV não apresentou efeitos carcinogênicos em nenhum dos testes aplicados, enquanto que, o TDF apresentou resultados positivos no ensaio de carcinogênese de longo prazo com camundongos fêmeas.

No levantamento feito por Friedrich e Olejniczak (2011) sobre os dados de carcinogenicidade de medicamentos para uso humano, autorizados na Europa entre 1995 e 2009, o EFV não foi um medicamento genotóxico e apresentou efeito negativo para carcinogenicidade em ratos, porém foi carcinogênico em camundongos. Em contraste, o TDF foi relatado como genotóxico e carcinogênico para ratos e camundongos, sendo relacionado com a indução de lipoma, pólipos no útero, tumores duodenais e adenoma hepático em camundongos, apresentando, portanto, risco carcinogênico para humanos.

Anteriormente, em um estudo conduzido por Guimarães et al. (2013), em nosso laboratório, demonstrou-se que a 3TC apresenta efeito mutagênico e/ou recombinogênico, no entanto, predominantemente recombinogênico no teste SMART. No presente estudo, quando combinado com TDF, de acordo com os nossos resultados, 3TC e TDF apresentaram antagonismo para efeitos genotóxicos, tanto no Ensaio Cometa, como no SMART. Estes medicamentos antirretrovirais, tanto isolados como combinados apresentaram prevalência de eventos recombinogênicos. A recombinação homóloga é um parâmetro importante para ser considerado na avaliação de risco/benefício carcinogênico e deveria ser realizada antes da prescrição de um medicamento.

Apesar dos genes de *D. melanogaster* apresentarem alta homologia aos genes humanos e o sistema enzimático relacionado ao citocromo P450 semelhante ao dos mamíferos (Andrade e Lehmann, 2003), o período de divergência evolutiva entre humanos e camundongos (cerca de 60 milhões de anos) é mais recente quando comparados humanos e *D. melanogaster*. Portanto, a homologia tanto em nível genotípico quanto na fisiologia e vias metabólicas entre humanos e camundongos pode chegar até a 90%, aumentando a possibilidade de existência de genes ortólogos.
Adicionalmente, depois do homem, o mamífero com o genoma melhor estudado é o camundongo (Godard, 2015).

Complementarmente, por sua alta confiabilidade e baixo custo, o teste do MN, que utiliza camundongos como organismo modelo, faz parte da bateria de testes genotóxicos recomendados para o registro de novos produtos químicos no mercado mundial, portanto é um método de triagem usado no desenvolvimento de novos fármacos (Hayashi et al., 2000; Ribeiro, 2003; Bonassi et al., 2007). No entanto, não foram encontrados registros desse teste com os combinados Combivir+EFV e TDF+3TC na literatura. Além disso, para não sacrificar um número excessivo de animais, a proposta deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade apenas das combinações de antirretrovirais Combivir+EFV e TDF+3TC. Para isso, foi aplicado o Ensaio Cometa e o teste do MN em medula óssea de camundongos.

Os dois combinados apresentaram resultados negativos no Ensaio Cometa, mas foram positivos no Teste do MN em 24 horas. Como no Teste do MN são observados danos no DNA em níveis cromossômicos, sugere-se que as combinações Combivir+EFV e TDF+3TC induziram efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos que não são detectados no Ensaio Cometa. Do mesmo modo, ao verificar a complementariedade entre o Ensaio Cometa e o Teste MN com 39 substâncias testes Hartmann et al. (2001) verificaram que , das 16 foram negativas no Ensaio Cometa e positivas no Teste do MN. Além disso, como a razão EPC/ENC foi elevada para ambos combinados, sugere-se que eles possam ser mitogênicos e que esta indução possa causar mais quebras cromossômicas, pois existirá um maior número de células em divisão.

De acordo com Hecht et al. (2013), o EFV têm efeito citotóxico seletivo em várias células tumorais, pois conduz à fosforilação e ativação da proteína supressora de tumor p53, apresentando um potencial antitumor e citostático. Como nossos testes foram realizados com células não-tumorais, sugere-se que essa seletividade do EFV ou ainda a interação entre os medicamentos no combinado possa ser a causa dos resultados negativos para citotoxicidade do Combivir+EFV observados em nossos dados.

Os medicamentos antirretrovirais que compõem o Combivir (AZT e 3TC) foram previamente descritos como citotóxicos para o crescimento de células CrFK. No entanto, não demonstram inibição significativa do crescimento de células CrFK falsamente infectadas (Bisset et al., 2002). Nos nossos resultados, o Combivir em combinação com EFV não induziu citotoxicidade e demonstrou efeito indutor de mitose por meio do aumento de eritrócitos policromáticos, portanto a combinação desses medicamentos pode reduzir o potencial citotóxico dos medicamentos isolados. Em relação a genotoxicidade, na concentração de 400 mg/kg administrada por via oral em camundongos, a AZT mostrou efeitos genotóxicos sobre linfócitos de sangue periférico, células do fígado e rins no Ensaio Cometa e indução de micronúcleos em células da medula óssea (Tripathi et al., 2008). A AZT foi genotóxica (Ensaio Cometa) em células H9 linfoblastóides humanas, mostrando relação dose-dependente nas concentrações de 0,05, 0,2, 0,4, 0,8, e 1,2 mM, sugerindo que os danos no DNA era lesões nos sítios alcalilábeis e não quebra de cadeia dupla de DNA, pois foi positivo apenas em pH 13,0, mas não em pH 8,0 ou pH 12,1 (Escobar et al., 2007).

Em outras investigações, a AZT foi genotóxica e 3TC não foi genotóxico quando administrado a camundongos recém-nascidos. Quando combinado 3TC não altera as respostas observadas com AZT isolado (Von Tungeln et al., 2002).

No estudo conduzido por Oliveira et al. (2014), o EFV apresentou efeitos genotóxicos pelo aumento da frequência de lesões do DNA apenas no cérebro de camundongos no tratamento subcrônico a uma concentração de 10 mg/kg, quando avaliou-se o potencial mutagênico e genotóxico do EFV pelo Ensaio Cometa em sangue periférico, coração, fígado e cérebro e pelo Teste do MN em células da medula óssea de camundongos com o tratamento agudo e subcrônico. No entanto, para os outros órgãos testados no Ensaio Cometa e também no Teste do MN, o EFV não apresentou efeitos genotóxicos e mutagênicos na mesma concentração.

Em nosso estudo a combinação Combivir+EFV demonstrou efeitos mutagênicos em níveis cromossômicos (aneugênese e/ou clastogênese) nos dois tempos testados (24 e 48 horas). Estes resultados podem ser consequência da contribuição da AZT para a genotoxicidade deste combinado, uma vez que nos dados do Shafik et al. (1991), a AZT causou aberrações cromossômicas em cultura de células de pacientes que ingeriram uma dose de 1200 mg/dia. Ainda pode haver a contribuição do Combivir, pois os nossos dados corroboram o estudo de Von Tungeln et al. (2007) com camundongos recémnascidos, demonstrando que tanto a AZT quanto AZT+3TC (Combivir) causaram uma diminuição na percentagem de reticulócitos (RETs), mas aumentaram a percentagem de RETs micronucleadas e de eritrócitos normocromáticos micronucleados.

Ao analisar os dados do combinado TDF+3TC no tempo de 24 horas, foi demonstrado ausência de indução de danos primários no DNA (Ensaio Cometa) ausência de citotoxicidade e indução de EPCMN. No tempo de 48 horas, este

combinado não induziu dano primário no DNA, não mostrou citotoxicidade e não induziu EPCMN em comparação com o controle negativo (p > 0,05).

A indução de mitose em EPC por esse combinado, observado pelo aumento da razão EPC/ENC, pode ser a resposta da ação dos resultados de 3TC, pois Baar et al. (2007), trabalharam com cultura de células HepG2 tratadas com 3TC, AZT e ABC, e demonstaram que as células apresentaram elevadas taxas de replicação do mtDNA (DNA mitocondrial) quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, o TDF não teve nenhum efeito na replicação do mtDNA nesta linhagem celular. Como 3TC interfere na replicação do mtDNA, sugere-se que esse medicamento possa interferir na proliferação celular e, consequentemente, causar a indução de mitose.

Além disso, em um estudo que avaliou o perfil citotóxico de alguns antirretrovirais em vários tipos de células, o TDF exibiu efeitos citotóxicos menores do que os demais NRTIs em todos os tipos de células testadas (Cihlar et al., 2002). Esta ausência de citotoxicidade foi confirmada nos nossos resultados, mesmo em combinação com 3TC.

Com relação à genotoxicidade, o TDF isolado não foi genotóxico no teste de Ames, no teste de aberração cromossômica em células pulmonares de hamster chinês (CHL) e no ensaio de MN nas condições experimentais testadas por Xing -lei et al., (2011). No entanto, tanto AZT como 3TC isolados mostraram indução de micronúcleos, por clastogenicidade, nas células binucleadas de cultura de linfócitos humanos, utilizando o ensaio de MN com bloqueador de citocinese (CBMN) (Bayram e Topaktas, 2008; Lourenço et al., 2010). Em nossos dados, quando combinados, TDF+3TC mostraram efeitos aneugênicos e/ou clastogênicos por indução de EPCMN.

Ao comparar os dois tempos (24 e 48 horas), Combivir+EFV aumentou a razão EPC/ENC em todas as concentrações testadas e TDF+3TC aumentou essa razão nas duas menores concentrações. Portanto, em 48 horas, a frequência do ENC diminuiu nessas concentrações. Em contraste, a indução de EPCMN diminuiu significativamente no tempo de 48 horas em todas as concentrações testadas dos dois combinados. Sugere-se que esta redução possa estar relacionada com a meia-vida dos compostos que é relativamente baixa em relação ao tempo de exposição: AZT trifosfato (5-9 horas) e 3TC trifosfato (11-33 horas) (Anderson et al., 2003); em pacientes com genótipos GG, GT e TT na posição CYP2B6 516, o EFV apresentou meia-vida de 23, 27 e 48 horas, respectivamente Ribaudo et al., (2006); Barditch-Corvo et al. (2001) relataram que, quando administrados 300 a 600 mg de TDF a adultos infectados com HIV-1, as

concentrações do fármaco no soro diminuem rapidamente com uma meia-vida entre 12 a 15 h.

Adicionalmente, como uma consequência de apoptose, pode ocorrer eliminação de células micronucleadas (Decordier et al, 2002; Bonassi et al., 2007; Decordier et al., 2008), sugerindo portanto que a apoptose seja uma possível causa da diminuição dos EPCMN em 48 horas. Complementarmente, como foi indicado por Schlegel e MacGregor (1984) há uma eliminação seletiva de EPCMN no sangue periférico, por conseguinte, sugere-se que o mesmo pode ocorrer na medula óssea.

A avaliação genotóxica de combinações de medicamentos aumenta a complexidade da avaliação dos seus efeitos colaterais incluindo as interações como o material genético. Como a genotoxicidade pode estar relacionada com a carcinogênese faz-se necessário o monitoramento de medicamentos antirretrovirais de uso crônico para traçar um perfil no que diz respeito aos possíveis efeitos secundários produzidos pelas terapias de combinação de medicamentos e, assim, servir de apoio para o desenvolvimento de novas estratégias nos protocolos de tratamento da AIDS.

CONCLUSÃO

Por meio desse estudo, demonstra-se que no SMART o medicamento isolado que mais aumenta a frequência total de manchas e, portanto apresentou maiores efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos, foi a 3TC, seguido pelo Combivir e TDF. O EFV foi negativo nesse teste. Quando combinados, TDF+3TC induziu maior frequência total de manchas quando comparado com o Combivir+EFV.

No Ensaio Cometa com *D. melanogaster*, apesar do Índice de Dano (ID) ser bem próximo, quando isolados, de maneira geral, os medicamentos que mais causaram danos no DNA foram: Combivir, TDF, 3TC e EFV. O combinado TDF+3TC causou mais dano ao DNA do que Combivir+EFV.

No Ensaio Cometa com medula óssea de camundongos os dois combinados foram negativos em todas as concentrações testadas para os dois tempos (24 e 48 horas).

No teste do MN, Combivir+EFV induziram mais EPCMN do que TDF+3TC nos dois tempos testados, portanto apresentou maior efeito mutagênico. Contrariamente, a razão EPC/NPC foi maior no combinado TDF+3TC, indicando maior potencial mitogênico desse combinado, nos dois tempos testados.

Com os resultados obtidos nesse estudo espera-se ampliar o conhecimento a respeito da atividade tóxica e genotóxica dessas combinações para que se trace um panorama mais amplo no que se refere aos possíveis efeitos secundários produzidos por essas terapias combinadas, visto que, é fundamental analisar constantemente o custobenefício de medicamentos de uso frequente e de longa duração para oferecer informação a respeito da segurança para a saúde humana, auxiliando na garantia da qualidade de vida dos pacientes que fazem uso de antirretrovirais.

REFERÊNCIAS

ADAMS M. D.; CELNIKER S. E.; HOLT R. A.; EVANS C. A.; GOCAYNE J. D.; AMANATIDES P. G.; et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287: 2185-2195 (2000).

ADJENE, J. O. e IGBIGBI, P. S. Effects of Chronic Administration of Efavirenz on the Inferior Colliculus of Adult Wistar Rats. **Fooyin J Health Sci**, v. 2, p. 105–108 (2010).

ANDERSON, P.L.; KAKUDA, T.M.; KAWLE, S.; FLETCHER, C.V. Antiviral dynamics and sex differences of zidovudine and lamivudine triphosphate concentrations in HIV-infected individuals. **AIDS**, v. 17, p. 2159-2168 (2003).

ANDRADE, H.H.R. e LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**, Canoas: Editora ULBRA, Edição Única, p. 281-307 (2003).

ANDRADE, H.H.R.; REGULY, M.L.; LEHMANN, M. Drosophila Cytogenetics Protocols. Edited by: D. S. Henderson. **Methods in Molecular Biology**, v. 247, p. 389-409 (2004).

ANDRÉ-SCHMUTZ, A.; DAL-CORTIVO, L.; SIX, E.; KALTENBACH, S.; FABIENNE COCCHIARELLA, F.; CHENADEC, J.L. CAGNARD, N.; CORDIER, A-G.,; BENACHI, A.; MANDELBROT, L.; AZRIA, E.; BOUALLAG, N.; LUCEL, S.; TERNaUX, B.; REIMANN, C.; REVYL, P.; RADFORD-EISS, I.; LESCHI, C.; RECCHIA, A.; MAVILIO, F.; CAVAZZANA, M.; BLANCHE, S. Genotoxic signature in cord blood cells of newborns exposed in utero to a zidovudine-based antiretroviral combination. **J Infec Dis**, v. 208, p. 235-43 (2013).

ATTIA, S.M.; AHMAD, S.F.; ZOHEIR, K.M.; BAKHEET, S.A.; HELAL, G.K.; ABD-ALLAH, A.R.; AL-HARBI, N.O.; AL-HOSAINI, K.A.; AL-SHABANAH, O.A. Genotoxic evaluation of chloroacetonitrile in murine marrow cells and effects on DNA damage repair gene expressions. **Mutagenesis**, v. 29, p. 55-62 (2013).

ÁVALOS, A.; HAZA, A. I.; DROSOPOULOU, E.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P.; MORALES, P. *In vivo* genotoxicity assessment of silver nanoparticles of different sizes by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila*. Food and Chemical Toxicology, (2015).

BAAR, M.P.; ROOIJ, E.R.; SMOLDERS, K.G.M.; VAN SCHIJNDEL, H.B.; TIMMERMMANS, E.C.; BETHELL, R. Effects of apricitabine and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors on replication of mitochondrial DNA in HepG2 cells. **Antiviral research**, v. 76, p. 68-74 (2007).

BARBIER, O.; TURGEON, D.; GIRARD, C.; GREEN, M. D.; TEPHLY, T. R.; HUM D. W.; BÉLANGER A. 3'-Azido-3'-deoxythimidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7). **Drug Metab Dispos**, v. 28, p. 497-502 (2000).

BARDITCH-CORVO, P.; DEEKS, S.G.; COLLIER, A.; SAFRIN, S.; COAKLEY, D.F.; MILLER, M.; KEARNEY, B.P.; COLEMAN, R.L.; LAMY, P.D.; KAHN, J.O.; MCGOWAN, I.; LIETMAN, O.S. Phase I/II trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults. Antimicrobial agentes and chemoterapy, v. 45, p. 2733-2739 (2001).

BAYRAM, S. e TOPAKTAS, M. Confirmation of the Chromosome Damaging Effects of Lamivudine in In Vitro Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Environ Mol Mutagen**, v. 49, p. 328-333 (2008).

BECK, R. C. R.; CARDOSO, S. G.; ATHAYDE, M. L.; CODEVILLA, C; OLIVEIRA, F. K.; DALMORA, S. L. Validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da lamivudina e zidovudina em comprimidos. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1225-1228 (2007).

BENFORD D. J.; HANLEY B. A.; BOTTRILL, K.; OEHLSCHLAGER, S.; BALLS, M.; BRANCA, F.; CASTENGNARO, J. J.; DESCOTES, J.; HEMMINIKI, K.; LINDSAY, D.; SCHITTER, B. Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. Altern. Lab. Anim., v. 28, p. 119-131 (2000).

BIALKOWSKA, A., BIALKOWSKI, K., GERSCHENSON, M., DIWAN, B. A., JONES, A. B., OLIVERO, O. A., POIRIER, M. C., ANDERSON, L. M., KASPRZAK, K. S. AND SIPOWICZ, M. A., 2000. Oxidative DNA damage in fetal tissues after transplacental exposure to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT). **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1059–1062 (2000).

BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nat Rev Genet.**, v. 6, p. 9-23 (2005).

BISHOP, A. J. R. e SCHIESTL, R. H. Role of homologous recombination in carcinogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 94-105 (2003).

BISHOP, J.B.; WITT, K.L.; TICE, R. R.; WOLFE, G.W. Genetic damage detected in CD-1 mouse pups exposed perinatally to 3'-azido-3'-deoxythymidine and dideoxyinosine via maternal dosing, nursing, and direct gavage. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 43, p. 3-9 (2004).

BISSET, L.R.; LUTZ, H.; BONI, J.; HOFMMAN-LEHMANN, R.; LUTHY, R.; SCHUPBACK, J.Combined effect of zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and abacavir (ABC) antiretroviral therapy in suppressing in vitro FIV replication. **Antiviral Research**, v. 53, p. 35–45 (2002).

BONASSI, S., ZNAOR, A., CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, P., BOLOGNESI, C., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIANOVA, E., FUCIC, A., HAGMAR, L., GORDANA, J., MARTELLI, A., MIGLIORE, L., MIRKOVA, E., SCARFI,M., ZIJNO, A., NORPPA, H., FECECH, M. An increased micronucleus frequency inperipheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v.28, p.625-631 (2007). BOSSI, P.; YVON, A.; MOUROUX, M.; HURAUX, J. M.; AGUT, H.; CALVEZ, V. Mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene observed in stavudine and didanosine strains obtained by in vitro passages. **Res. Virol.**, 149, 355-361 (1998).

BRAMBILLA, G.; MATTIOLI, F.; ROBBIANO, L.; MARTELLI, A. Studies on genotoxicity and carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs. **Mutagenesis**, p. 1–27 (2011).

BRAMBILLA, G.; MATTIOLI, F.; ROBBIANO, L.; MARTELLI, A. Update of carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 750, p. 1-51 (2012).

BRENNAN L.J., HAUKEDAL J.A., EARLE J.C., KEDDIE B., HARRIS H.L. Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of Wolbachia-infected Drosophila simulans. **Insect. Mol. Biol.**, v. 21, p. 510-520 (2012).

BROWN, K. C., PAUL., S. e KASHUBA, A. D. M. Drug interactions with new and investigational antiretrovirals. **Clinical Pharmacokinet**, 48(4):211-241 (2009).

BUTT, A. A.; CHANG, C. C.; KULLER, L.; GOETZ, M. B.; LEAF, D.; RIMLAND D.; GIBERT, C. L.; OURSLER, K. K. RODRIGUEZ-BARRADAS, M. C.; LIM, J.; KAZIS, L. E. GOTTLIEB, S.; JUSTICE, A. C. FREIBERG, M. S. Risk of heart failure with human immunodeficiency virus in the absence of prior diagnosis of coronary heart disease. Arch Intern Med., v. 171, p. 737–743 (2011).

BUMPUS, N. N. Efavirenz and 8-hydroxyefavirenz induce cell death via a JNK- and BimEL-dependent mechanism in primary human hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 257, p. 227-234 (2011).

CARMONA, E. R.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity testing of two leadcompounds in somatic cells of Drosophila melanogaster. **Mutation Research**, v. 724, p. 35-40 (2011).

CARMONA, E. R.; GUECHEVA, T. N.; CREUS, A.; MARCOS, R. Proposal of an In Vivo Comet Assay Using Haemocytes of Drosophila melanogaster. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, p. 165-169 (2011).

CARR, A. e COOPER, D. A. Adverse effects of antiretroviral therapy. **The Lancet.** v. 356, p. 1423-30 (2000).

CARTER, M. M.; TORRES, S. M.; COOK JR, D. L.; MCCASH, C. L.; YU, M.; WALKER, V. E. e WALKER, D. M. Relative mutagenic potencies of several nucleoside analogs, alone or in drug pairs, at the HPRT and TK loci of human TK6 lymphoblastoid celss. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, p. 239-247, (2007).

CARVALHO, T. H. F. e LOPES, O. U. O emprego de camundongo geneticamente modificado como modelo de estudo para doenças cardiovasculares. In: X Simpósio

Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. **Medicina Ribeirão Preto (online)**, v. 39, n.1, p. 110-116 (2006).

CHEMFINDER. Disponível em:

(<<u>http://www.chemfinder.com/chembiofinder/Forms/Search/ContentArea/ChemBio</u> VizSearch.aspx?FormGroupId=8&AppName=CHEMBIOFINDER&AllowFullSearch=t rue&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=6&SearchCriteriaValue= efavirenz&CurrentIndex=0>. Acesso em: 04/07/2012 às 16:45 h. (a)

CHEMFINDER. Disponível em:

<http://www.chemfinder.com/chembiofinder/Forms/Search/ContentArea/ChemBioVizS earch.aspx?FormGroupId=8&AppName=CHEMBIOFINDER&AllowFullSearch=true &KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=6&SearchCriteriaValue=ten ofovir+disoproxil+fumarate&CurrentIndex=0>. Acesso em: 04/07/2012 às 16:42 h. (b)

CHIAPETTA, D. A. HOCHT, C.; TAIRA, C.; SOSNIK, A. Efavirenz-loaded polymeric micelles for pediatric anti-HIV pharmacotherapy with significantly higher oral bioavailability. **Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 11-23. Disponível em: < http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/nnm.09.90>. Acesso em: 27/07/2015 às 09:54h.

CHIAPPINI, E.; BERTI, E.; GIANESINB, K.; PETRARA, M. R.; GALLI, L.; GIAQUINTOC, C.; MARTINOA, M.; ROSSI, A. D. Pediatric Human Immunodeficiency Virus infection and cancer in the Highly Active Antiretroviral Treatment (HAART) era. **Cancer Lett.**, v. 28 n. 347, p. 38-45 (2014).

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p. 11-23 (2007).

CHUNG, H. W.; KANG, S. J.; KIM, S. Y. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. **Mutation Research**, v. 516, p. 49-56 (2002).

CIHLAR, T.; BIRKUS, G.; GREENWALT, D.E.; HITCHCOCK, M.J.M. Tenofovir exhibits low cytotoxicity in various human cell types: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. **Antiviral Research**, v. 54, p. 37-45 (2002).

CLOAD, P. A. A review of the pharmacokinetics of zidovudine in man. Journal of Infection, v. 18, p. 15-21, (I989).

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; ROJAS, E.; DHAWAN, A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETTI, M.; SPEIT, G.; BONASSI, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutat. Res.**, v. 759, p. 27-39 (2014).

COLLINS, A.R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochim Biophys Acta**. v. 1840, p. 794–800 (2014).

CRETTON, E. M.; SCHINAZI, R.F.; MCCLURE, H. M.; ANDERSON, D. C.; SOMMADOSSI, J. P. Pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine and its catabolites and interactions with probenecid in rhesus monkeys. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 35, n. 5, p. 801-807 (2007).

DECLERCQ, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 307-320 (2009).

DECLERCQ, E. e HOLÝ, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. **Nature Publishing Group**, v. 4, p. 928-940 (2005).

DECORDIER, I.; CUNDARI, E.; KIRSCH-VOLDERS, M. Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: Crosstalk between ploidy control and apoptosis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,** v. 651, p. 30–39 (2008).

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

DELANEY, W. E.; RAY, A. S.; YANG, H; QI, X.; XIONG, S., ZHU, Y e MILLER, M. M. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. **Antimicrob Agents Chemother.** v.50, p. 2471 – 2477 (2006).

DESAI, V. G.; LEE, T.; MOLAND, C. L.; BRANHAM, W. S.; VON TUNGELN, L.S.; BELAND, F. A.; FUSCOE, J. C. Effect of short-term exposure to zidovudine (AZT) on the expression of mitochondria-related genes in skeletal muscle of neonatal mice. **Mitochondrion**, v. 9, p. 9–16 (2009).

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

DÍAZ-DELFÍN, J.; GUTIÉRREZ, M. del M.; GALLEGO-ESCUREDO, J. M.; DOMINGO, J. C.; MATEO, M. G.; VILLARROYA, F.; DOMINGO, P.; GIRALT, M. Effects of nevirapine and efavirenz on human adipocyte differentiation, gene expression, and release of adipokines and cytokines. **Antiviral Research**, v. 91, p. 112-119 (2011).

DING, G. R.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSHI, J. Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. **Mutagenesis**, v. 18, p. 439-443 (2003).

DUAN, C.; POTICHA, D.; STOECKLI, T. C.; PETROPOULOS, C. J.; WHITCOMB, J. M.; MCHENRY, C. S.; KURITZKES, D. R. Inhibition of Purified Recombinant Reverse Transcriptase from Wild-Type and Zidovudine-Resistant Clinical Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Zidovudine, Stavudine, and Lamivudine Triphosphates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 1336-1340 (2001).

ENTESHAMI, M.; SCARTH, B. J.; TCHESNOKOV, E. P.; DASH, C.; GRICE, S. F. J. L.; HALLENBERGER, S.; JOCHMANS, D.; GOTTE, M. Mutations M184V and Y115F in HIV-1 Reverse Transcriptase Discriminate against "Nucleotide-competing Reverse Transcriptase Inhibitors". **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 29904-29911 (2008).

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In Silva J, Erdtmann B, Pêgas-Henrique JA. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Ed. Alcance, p 23-47 (2003).

ESCOBAR, P. A.; OLIVERO, O. A.; WADE, N. A.; ABRAMS, E. J.; NESEL, C. J.; NESS, R. B.; DAY, R. D.; DAY, B. W.; MENG, Q.; O'NEILL, J. P.; WALKER, D. M.; POIRIER, M. C.; WALKER, V. E.; BIGBEE, W. L. (2007) Genotoxicity assessed by the comet and GPA assays following in vitro exposure of human lymphoblastoid cells (H9) or perinatal exposure of mother child pairs to AZT or AZT-3TC. **Environmental and Molecular Mutagenesis,** v. 48, p. 330-343 (2007).

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L. & O'NEIL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59 (1995).

FESTING, M. F. W.; BAUMANS, V.; COMBES, D. R.; HADLER, M.; HENDRIKSEN F. M.; HOWARD, B. R.; LOVELL, D. P.; MOORE, G. J.; OVEREND, P.; WILSON M. S. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. **Altern. Lab. Anim.**, v. 26, p. 283-301 (1998).

FONSECA, C. A e PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v. 16, p. 7-8, (2004).

FRANCHI, L. P.; PENTIADO, N. H. G. R.; SILVA, R. N.; GUIMARÃES, N. N.; JESUÍNO, R. S. A.; ANDRADE, H. H. R. de; LEHMANN, M. e CUNHA, K. S. Mutagenic and recombinagenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, (2009).

FREI, H. e WURGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308 (1988).

FREIRE-MAIA, N. e PAVAN, C. Introdução ao estudo da drosófila. **Cultus**. v. 1, n. 1 (1949).

FRIEDRICH, A. e OLEJNICZAK, K. Evaluation of carcinogenicity studies of medicinal products for human use authorised via the European centralised procedure (1995–2009). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p. 225-248 (2011).

GAIVÃO, I. e SIERRA, M. Drosophila comet assay: insights, uses and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 1-8 (2014).

GALLANT, J. E. e DERESINSKI, S. Tenofovir Disoproxil Fumarate. Clin Infect Dis., v. 37, n. 7, p. 944-950 (2003).

GALLANT, J. E.; DEJESUS, E.; ARRIBAS, J. R.; POZNIAK, A. L.; GAZZARD, B.; CAMPO, R. E.; LU, B.; MCCOLL, D.; CHUCK, S.; ENEJOSA, J.; TOOLE, J. J.; CHENG, A. K. Tenofovir DF, Emtricitabine, and Efavirenz vs. Zidovudine, Lamivudine, and Efavirenz for HIV. **N Engl J Med**, v. 354, p. 251-260 (2006).

GATEHOUSE, D. G.; WILCOX, P.; FORSTER, R.; ROWLAND, I. R. & CALLANDER, R. D. **Bacterial mutation assays.** In: Kirkland, D. J. Basic mutagenicity tests: UKEMS recommended procedures. New York, Cambridge University Press (Ed.), Cap. 2, p. 13-61 (1990).

GODARD, A. L. B. **O camundongo como modelo animal de patologia humana**. Disponível em: < <u>https://www.ufmg.br/proex/cpinfo/educacao/docs/02i.pdf</u>>. Acesso em: 25/07/2015 às 19:28 h.

GOLDSCHALK, R.W.; ERSSON, C.; RISO, P.; PORRINI, M.; LANGIE, S.A.; VANSCHOOTEN, F.J.; AZQUETA, A.; COLLINS, A.R.; JONES, G.D.D.; KWOK, R.W.L.; PHILLIPS, D.H.; SOZERI, O.; ALLIONE, A.; MATULLO, G.; MOLLER, L.; FORCCHAMMER, L.; LOFT, S.; MØLLER, P. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay:aninter-laboratory comparis on within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). **Mutat. Res.**, v. 757, p. 60-67 (2013).

GONZALEZ CID, M. E LARRIPA, I. Genotoxic activity of azidothymidine (AZT) in in vitro systems. **Mutat. Res.**, v. 321, p.113–118 (1994).

GOUNDEN, V.; VAN NIEKERK, C.; SNYMAN, T.; GEORGE, J. A. Presence of the CYP2B6 516G> T polymorphism, increased plasma Efavirenz concentrations and early neuropsychiatric side effects in South African HIV-infected patients. **AIDS Research and Therapy**, v. 7, (2010).

GRAF, U.; van SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*.**Mutat. Res.**, v. 271, p. 59-67.

GRAF, U.; WURGLER, F. E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Enviromental Mutagenesis**, v. 6, p. 153-188 (1984).

GUANGGANG, X.; DIQIU, L.; JIANZHONG, Y.; JINGMIN, G.; HUIFENG, Z.; MINGAN, S.; LIMNG, T. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. **Food Chem Toxicol**.; v. 53, p. 352-358 (2013).

Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Washington, D.C.: **Department of Health and Human Services.** Disponível em: http://AIDSinfo.nih.gov/guidelines>. Acesso em: 19/07/2015 às 14:35h.

GUIMARÃES, N. N. Estudo tóxico genético de combinações de antirretrovirais inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa. [tese] Goiânia: Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás (2013).

GUIMARÃES, N. N.; ANDRADE, H. H. R. de; LEHMANN, M.; DIHL, R. R. e CUNHA, K. S. The genetic toxicity effects of lamivudine and stavudine antiretroviral agents. **Expert Opin. Drug Saf.**, v. 9, n. 4, p. 1-11 (2010).

GUIMARÃES, N. N.; PEREIRA, K. C.; ANDRADE, H. H. R. de; LEHMANN, M. e CUNHA, K. S. Comparative Analysis of Genetic Toxicity of AZT and ddI Antiretrovirals in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 49, p. 312-317 (2008).

GUIMARÃES, N. N.; SILVA, C. J.; ANDRADE, H. H. R.; DIHL, R. R.; LEHMANN, M.; CUNHA, K. S. Comparative analysis of genetic toxicity of antiretroviral combinations in somatic cells of Drosophila melanogaster. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 299-309 (2013).

HARTMANN, A.; SCHUMACHER, M.; PLAPPERT-HELBIG, U.; LOWE, P.; SUTER, W.; MUELLER, L. Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. **Mutagenesis**, v. 19, p. 51-59 (2004).

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H.J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 843–858 (2001).

HAWKINS, T. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. Antiviral Res, v. 85, p. 201-209 (2010).

HAYASHI, M., MACGREGOR, J.T., GATEHOUSE, D., ADLER, I.D., BLACKEY, D.H., DERTINGER, S., GOPALA, K., TAKESHI, M., RUSSO, A. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Some aspect of protocol design including repeated treatments, integation with toxicity testing and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.234-252 (2000).

HECHT, M.; HARRER, T.; BUTTNER, M.; SCHWEGLER, M.; ERBER, S.; FIETKAU, R.; DISTEL, L.V. Cytotoxic effect of efavirenz is selective against cancer cells and associated with the cannabinoid system. **AIDS**, v. 27, p. 2031-2040 (2013).

HEDDLE, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-190 (1973).

HERD, O.; FRANCIES, F.; SLABBERT, J.; BAEYENS, A. The Effect of HIV and Antiretroviral Therapy on Chromosomal Radiosensitivity, **AIDS Clin Res**, v. 5, p. 1-6 (2014).

IYIDOGAN, P. e ANDERSON, K. S. Understanding the molecular mechanism of sequence dependent Tenofovir removal by HIV-1 reverse transcriptase: Differences in primer binding site versus polypurine tract. **Antiviral Research** (2012).

JI, H. J.; RHA, S. Y.; JEUNG, H. C.; YANG, S. H.; AN, S. W.; CHUNG, H. C. Cyclic induction of senescence with intermittent AZT treatment accelerates both apoptosis and

telomere loss. Breast Cancer Res. Treat., v. 93, p. 227-236 (2005).

JOHANSSON, M.; ROMPAY, A. R. V.; DEGRÈVE, B.; BALZARINI, J.; KARLSSON, A. Cloning and Characterization of the Multisubstrate Deoxyribonucleoside Kinase of *Drosophila melanogaster*. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, p. 23814-23819 (1999).

JOHNSON, T. J.; GUPTA, K. M.; FABIAN, J.; ALBRIGHT, T. H. e KISER, P. F. Segmented polyurethane intravaginal rings for the sustained combined delivery of antiretroviral agents dapivirine and tenofovir. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 203–212 (2010).

KASTENBAUM, M.A. e BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 9, p. 527–549 (1970).

KOKSAL, P. M. e GURBUZEL, M. Analysis of genotoxic activity of ketamine and rocuronium bromide using the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 39, n. 2, p. 628-634 (2015).

KORNBERG, T. B. e KRASNOW, M. A. The *Drosophila* genome sequence: implications for biology and medicine. **Science**, v. 287, p. 2218-2220 (2000).

KRAYNAK, A. R.; BARNUM, J. E.; CUNHINGAM, C. L. NG, A.; YKORUK, B. A.; BENNET, B.; STOFREGGEN, D.; MERSCHMAN, M.; FREELAND, E.; GALLOWAY, S. M.; Alkaline comet assay in liver and stomach, and micronucleus assay in bone marrow, from rats treated with 2-acetylaminofluorene, azidothymidine, cisplatin, or isobutyraldehyde. **Mutatio Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 786-788, p. 77-86 (2015).

KRISHNA, G. e HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166 (2000).

LEE, H.; HANES, J; JOHNSON, K. A. Toxicity of Nucleoside Analogues Used to Treat AIDS and the Selectivity of the Mitochondrial DNA Polymerase. **Biochemistry**, v. 42, n. 50, p. 14712-14719 (2003).

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, p. 839 (1995).

LENZ S.; KARSTEN P.; SCHULZ J. B.; VOIGT A. Drosophila as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. **J. Neurochem.**, v. 127, p. 453-460 (2013).

LLOYD, T. E. e TAYLOR, J. P. Flightless Flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. Ann N Y **Acad Sci**; 1184: e1–20 (2010).

LOEWE, S. Antagonism and antagonist. Pharmacol. Rev., v. 9, p. 237–242 (1957).

LOURENÇO, E.D.; AMARAL, V.S.; LEHMANN, M.; DIHL, R.R.; SCHMITT,

V.M.; CUNHA, K.S.; REGULY, M.L.; ANDRADE, H.H.R. Micronuclei induced by reverse transcriptase inhibitors in mononucleated and binucleated cells as assessed by the cytokinesis-block micronucleus *assay*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 33; p. 756-760 (2010).

MAFFEI, F.; FORTI, G. C.; CASTELLI, E.; STEFANINI, G. F.; MATTIOLI, S.; HRELIA, P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 514, p. 49-58 (2002).

MIKLOS, G. L. G. e RUBIN, G. M. The Role of the Genome Project Review in Determining Gene Function: Insights from Model Organisms. **Cell**, v. 86, p. 521–529 (1996).

MILLER, C. J.; BAKER, J. V.; BORMANN, A. M.; ERLANDSON, K. M.; HUPPLER HULLSIEK, K.; JUSTICE, A. C.; NEUHAUS, J.; PAREDES, R.; PETOUMENOS, K.; WENTWORTH, D.; WINSTON, A.; WOLFSON, J.; NEATON, J. D. Adjudicated Morbidity and Mortality Outcomes by Age among Individuals with HIV Infection on Suppressive Antiretroviral Therapy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4 (2014).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: < http://www.aids.gov.br/pagina/quais-saoos-antirretrovirais> Acesso em: 20/09/2016 às 16:24h (2016c).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil). Acesso em: 20/09/2016 às 12:26h (2016a).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: http://www.aids.gov.br/pagina/o-que-e-aids>. Acesso em: 20/09/2016 às 16:00h (2016b).

MORAES FILHO, A. V. Estudo da toxicidade genética de Efavirenz (EFV) e Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. [dissertação] Goiânia: Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás(2013).

MUNCH-PETERSEN, B.; PISKUR, J.; SONDERGAAR, L. Four Deoxynucleoside Kinase Activities from *Drosophila melanogaster* Are Contained within a Single Monomeric Enzyme, a New Multifunctional Deoxynucleoside Kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 3926-3931 (1998).

NUNES, W. B. Avaliação do potencial mutagênico e/ou recombinogênico do algodãozinho do campo em células somáticas e germinativas de D. melanogaster. [dissertação] Goiânia: Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás (2000).

OGBURN, E. T.; JONES, D. R.; MASTERS, A. R.; XU, C.; GUO, Y. e DESTA, Z. Efavirenz Primary and Secondary Metabolism *In Vitro* and *In Vivo*: Identification of Novel Metabolic Pathways and Cytochrome P450 2A6 as the Principal Catalyst of Efavirenz 7-Hydroxylation. **Drug metabolism and disposition**. v. 38, n. 7, p.1218–1229 (2010).

OGIWARA, Y.; SUGIURA, M.; WATANABE, K.; TAWARA, J.; ENDO, E.;

MARUYAMA, H.; TSUJI, S.; MATSUE, K.; YAMADA, H.; WAKO, Y.; KAWASAKO, K.; Evaluation of the repeated-dose liver, bone marrow and peripheral blood micronucleus and comet assays using kojic acid. **Mutatio Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 780-781, p. 111-116 (2015).

OLIVEIRA, H. M.; DAMIANI, A. P.; DIAS, R. O.; ROMÃO, P. R. T.; ANDRADE, V. M. Effect of antirretroviral drugs on the DNA damage in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology,** v. 37, p. 390-395 (2014).

OLIVERO, A.; MING, J. M.; DAS, S.; VAZQUEZ, I. L. Human inter-individual variability in metabolism and genotoxic response to zidovudine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, p. 158–164 (2008).

OLIVERO, O. A.; TORRES, L. R.; GORJIFARD, S.; MOMOT, D.; MARROGI, E.; DIVI, L. R.; LIU, Y.; WOODWARD, R. A.; SOWERS, M. J.; POIRIER, M. C. Perinatal exposure of patas monkeys to antirretroviral nucleoside reverse-transcriptase inhibitors induces genotoxicity persistent for up to 3 years of age. J Infect Dis; 208: 244-248 (2013).

PANDEY U. B. e NICHOLS, C. D. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. **Pharmacol Rev.**, v. 63: p. 411-436 (2011).

PARIKH, U. M.; BACHELER, L.; KOONTZ, D.; MELLORS, J. W. The K65R Mutation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Exhibits Bidirectional Phenotypic Antagonism with Thymidine Analog Mutations. Journal of virology, v. 80, p. 4971-4977 (2006).

PECANHA, E. P., ANTUNES, O. A., TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p.1108-1116 (2002).

POZNIAK, A. L.; GALLANT, J. E.; DEJESUS, E.; ARRIBAS, J. R.; GAZZARD, B.; CAMPO, R. E.; CHEN, S.S.; MCCOLL, D.; ENEJOSA, J.; TOOLE, J. J.; CHENG, A. K. Tenofovir Disoproxil Fumarate, Emtricitabine, and Efavirenz Versus Fixed-Dose Zidovudine/Lamivudine and Efavirenz in Antiretroviral-Naive Patients Virologic, Immunologic, and Morphologic Changes—A 96-Week Analysis. J Acquir Immune Defic Syndr, v. 43, (2006).

RABELO-GAY, M. N. **Teste do Micronúcleo em medula óssea**. In: RABELO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.L.R., MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Editora FCA. 246 p. (1991).

RAJU, N. A. e BEGON, S. Simultaneous RP-HPLC Method for the Estimation of the Emtricitabine, Tenofovir Disoproxil Fumarate and Efavirenz in Tablet Dosage Forms. **Research J. Pharm. and Tech.** v. 4, n.1, p. 522-525 (2008).

RAKHMANINA, N. Y. e ANKER, J. N. Efavirenz in the Therapy of HIV Infection. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.** v. 6, p. 95-103 (2010).

RAMAKRISHNAN, R. e JUSKO, W.J. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. **Inter. Immunophar.**, v. 1, n. 12, p. 2035-2042 (2001).

RE, M. C.; BON, I.; MONARI, P.; BORDERI, M.; GIBELLINI, D.; SCHIAVONE, P.; VITONE, F.; CHIODO, F.; LA PLACA, M. Mutation patterns of the reverse transcriptase genes in HIV-1 infected patients receiving combinations of nucleoside and non nucleoside inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 388-394 (2003).

RERKS-NGARM, S. PITISUTTITHUM, P.; NITAYAPHA, S.; KAEWKUNGWAL, J.; CHIU, J.; PARIS, R.; PREMSRI, N.; NANWAT, C.; SOUZA, M. de; ADAMS, E.; BENENSON, M.; GURUTHA, S.; TARTAGLIA, J.; MCNEIL, J. G.; FRANCIS, D. P.; STABLEIN, D.; BIRX, D. L.; CHUNSUTTIWAT, S.; KHAMBOONRUANG, C.; THONGCHAROEN, P.; ROBB, M. L.; MICHAEL, N. L.; KUNASOL, P.; KIM, J. H. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. **N** Engl J Med, v. 361, p. 2209-2220 (2009).

RIBAUDO, H.J.; HAAS, D.W.; TIERNEY, C.; KIM, R.B.; WILKINSON, G.R.; GULICK, R.M.; CLIFFORD, D.B.; MARZOLINI, C.; FLETCHER, C.V.; TASHIMA, K.T.; KURIZTKES, D.R.; ACOSTA, E.P. Pharmacogenetics of plasma efavirenz exposure after treatment discontinuation: an adult AIDS clinical trials group study. **Clin Infect Dis.** v. 42, p. 401-407 (2006).

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. **Mutagênese ambienta**l. Canoas: Editora ULBRA, p.173-200 (2003).

RICHMAN, D. D.; MARGOLIS, D. M.; DELANEY, M.; GREENE, W. C.; HAZUDA, D.; POMERANTZ, R. J. The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection. **Science**, v. 323, p. 1304-1307 (2009).

RIM, K-T. e KIM, S-J. A Review on Mutagenicity Testing for Hazard Classification of Chemicals at Work: Focusing on *in vivo* Micronucleus Test for Allyl Chloride. **Safety anda Health at Work**, (2015).

SANTOS, J. L.; VARANDA, E. A.; LIMA, L. M.; CHIN, C. M. Avaliação da atividade mutagênica da talidomida pelo teste de ames. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 154-158 (2007).

SANTOS, B.F. **Criação e manejo de camundongos**. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.115-118 (2002).

SCHILLING, B. E.; NELSON, D. R.; PROCTOR, J. E.; DIAMOND, S. S.; KAUL, S.; HAWKINS, H. C. The nonclinical toxicologic profile of stavudine. **Current Therapy Research**, v. 56, p. 201-218 (1995).

SCHLEGEL, R. e MACGREGOR, J.T. The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats Implications for cytogenetic screening. **Mutation Research**, v. 127, p. 169-174 (1984).

SHAFIK, H. M.; NOKTA, M. A.; POLLARD, R. B. Recombinant human interferon beta ser protects against zidovudine-induced genetic damage in AIDS patients. **Antiviral Research**, v. 16, p. 205-212 (1991).

SIDDIQUE, H. R.; GUPTA, S. C.; DHAWAN, A.; MURTHY, R. C.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in Drosophila melanogaster. **Environ Mol Mutagen**., v. 46, p. 189-197 (2005).

SILVA, E. J. **Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar.** [dissertação]. Vitória de Santo Antão: Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco (2012).

SILVA, J.; HEUSER, V. e ANDRADE, V. Biomonitoramento ambiental. *In*: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**, Porto Alegre: Editora Alcance, p. 193-194 (2003).

SINGH N.P.; MCCOY M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER E.L. A simple technique for quantitation o flow levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.** v. 175, p. 184-191 (1998).

SOBELS, F. H e VOGEL, E. The capacity of Drosophila for detecting relevant genetic damage. **Mutat Res.**, v. 41, p. 95-106 (1976).

SOLAROLI, N.; BJERKE, M.; AMIRI, M. H.; JOHANSSON, M.; KARLSSON, A. Active site mutants of *Drosophila melanogaster* multisubstrate deoxyribonucleoside kinase. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 2879–2884 (2003).

ST. JOHN, M. A. R. e XU, T. INSIGHTS FROM MODEL SYSTEMS - Understanding Human Cancer in a Fly? **Am. J. Hum. Genet.**, v. 61, p. 1006–1010 (1997).

TINTORI, C.; BRAI, A. L.; FALLACARA, A. L.; FAZI, R.; SCHENONE, S.; BOTTA M. Protein–protein interactions and human cellular cofactors as new targets for HIV therapy. **Curr Opin Pharmacol**, v. 18, p. 1-8 (2014).

TRIPATHI, V.N.; PAWAR, A.A.; VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G.B. Use of the alkaline comet assay for the detection of transplacental genotoxins in newborn mice. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,** v. 653, p. 134-139 (2008).

TURNER, D.; BRENNER, B.; WAINBERG, M. A. Relationships among various nucleoside resistance-conferring mutations in the reverse transcriptase of HIV-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 53-57 (2004).

UNAIDS: Disponível em: < http://www.unaids.org.br/documentos/UNAIDS_GR2012_em_en.pdf> Acesso em: 27/07/2016 às 15:14h. UNAIDS: Disponível em: <http://www.unaids.org.br/documentos/Treatment_Report_2015.pdf> Acesso em: 28/07/2015 às 13:00h (**2016b**).

VILLELA, I. V., LAU, A., SILVEIRA, J., PRÁ, D., ROLLA, H. C. E SILVEIRA, J. D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. *In*: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**, Porto Alegre: Editora Alcance, p. 158-161 (2003).

VOGEL, E. W. Introduction into Basic Principles of Genetic Toxicology. Nitherlands: Leinden, (1989).

VON TUNUNGELN, L. S.; DOBROVOLSKY, V. N.; BISHOP, M. E.; SHADDOCK, J. G.; HEFLICH, R. H.; BELAND, F. A. Frequency of Tk and Hprt lymphocytemutants and bone marrow micronuclei in mice treated neonatally with zidovudine and didanosine. **Mutagenesis**, v. 19, p. 307–311 (2004).

VON TUNGELN, L.S.; HAMILTON, L.P.; DOBROVOLSKY, V.N.; BISHOP, M.E.; SHADDOCK, J.G.; HEFLICK, R.H.; BELAND, F.A. Frequency of *Tk* and *Hprt* lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in B6C3F₁/*Tk*+/- mice treated with zidovudine and lamivudine. **Carcinogenesis**. v. 23: p. 1427-1432 (2002).

VON TUNGELN, L.S.; WILLIAMS, L.D.; DOERGE, D.R.; SHADDOCK, J.G.; MCGARRITY, L.; MORRIS, S.M.; MITTELSTAEDT, R.A.; HEFLICH, R.H.; BELAND, F.A. Transplacental drug transfer and frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and peripheral blood micronuclei in mice treated transplacentally with Zidovudine and Lamivudine. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, p.258-269 (2007).

WALKER, D. M.; KAJON, A. E.; TORRES, S. M.; CARTER, M. M.; MCCASH, C. L.; SWENBERG, J. A.; UPTON, P. B.; HARDY, A. W.; OLIVERO, O. A.; SHEARER, G. M.; POIRIER, M. C.; WLAKER, V. E. WR1065Mitigates AZT-ddI-InducedMutagenesis and Inhibits Viral Replication. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 50, p. 460-472 (2009).

WU, K. M.; POWLEY, M. W. e GHANTOUS, H. Timing of carcinogenicity studies and predictability of genotoxicity for tumorigenicity in anti-HIV drug development. **International Journal of Toxicology**, v. 31, n.3, p. 211-221 (2012).

XING-LEI, F.; LEI, J.; JIAN-WEI, J.; MAO, L. Genetictoxicity of tenofovir dipivoxil fumarate. **Chinese Journal of Antibiotics**, (2011).

YUEN, G. J.; MORRIS, D. M.; MYDLOW, P. K.; HAIDAR, S.; HALL, S. T.; HUSSEY, E. K. Pharmacokinetics, Absolute Bioavailability, and Absorption Characteristics of Lamivudine, **The Journal of Clinic Pharmacology**, v. 35, n. 12, p. 1174-1180 (1995).