



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Adiles Paulo de Lima

Avaliação genotóxica do composto PT-31, do Elixir Sanativo® e do extrato do Sanativo® em linhagens de *Drosophila melanogaster* e *Saccharomyces cerevisiae*

Recife
2015

Adiles Paulo de Lima

Avaliação genotóxica do composto PT-31, do Elixir Sanativo® e do extrato do Sanativo® em linhagens de *Drosophila melanogaster* e *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior.

Coorientador: Prof^a Dr^a Tania Tassinari Rieger.

Recife
2015

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Lima, Adiles Paulo de

Avaliação genotóxica do composto PT-31, do Elixir Sanativo® e do extrato do Sanativo® em linhagens de *Drosophila melanogaster* e *Saccharomyces cerevisiae*/ Adiles Paulo de Lima– Recife: O Autor, 2015.

92 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior.

Coorientador: Prof^a Dr^a Tania Tassinari Rieger.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2015.

Inclui bibliografia e apêndices

- 1. *Drosophila melanogaster* 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. Mutagênese 4. Compostos terapêuticos I. Moraes Junior, Marcos Antonio de (orientador) II. Título**

595.773

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-152

Adiles Paulo de Lima

Avaliação genotóxica do composto PT-31, do Elixir Sanativo® e do extrato do Sanativo® em linhagens de *Drosophila melanogaster* e *Saccharomyces cerevisiae*

Aprovado em 12/03/2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco/ Genética

4º

Profª Drª Neide Santos (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco/ Genética

3º

Profª Drª Ana Christina Brasileiro Vidal (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco/ Genética

2º

Profª Drª Maira Galdino da Rocha Pitta (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco/ Inovação terapêutica

1º

Profª Drª Mônica Lúcia Adam (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco/ CAV

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria Valdira -
“mom”, por todo o suporte material, sentimental e
emocional em minha vida. O verdadeiro amor.

Agradecimentos

Ao Grande Espírito que impulsiona a evolução da vida, incessantes agradecimentos. Toda a minha família, constante companhia, apoio, conforto e alegria, em nome de minha mãe Valdira, irmãos Hilbert e Ellano, avó Aliete, e tias Valdete, Verônica, Vilma, Valdenice e Valdilene, que me foi concedida a oportunidade para conviver.

Ao dedicado orientador, Marcos Moraes, pela parceria, apoio e incentivo na consolidação deste trabalho.

Aos adoráveis professores do LED, professor José Ferreira e professora Tania Rieger, pelo grande incentivo material, moral e emocional na formação, implementação e auxílio neste trabalho.

Caros amigos de contato diário: Morse Júnior, Antônio Terto, Jéssica Vasconcelos, Tyago Eufrásio, Darlene Paiva, Manassés Daniel, Dijanah Cota, bem como outros colegas, companheiros e agregados do Laboratório de Experimentação em Drosophilas/Genética/UFPE, agradeço em nome de Ana Milena, Lyane e Fernanda Ito. Participaram, de uma forma ou de outra, na realização deste trabalho, como também pela amizade construída, constituíram minha família pernambucana, sei que de alguma maneira sempre estarão comigo. Agradeço a todos indistintamente, meu grande abraço.

Queridos amigos de Arapiraca, Aracaju, São Cristóvão, Recife, Teresina e do restante do Brasil, estamos juntos ou estaremos ainda mais unidos, assim que o Mestre Jesus permitir – agradeço a todos nas figuras de Denisson, Rômulo e Caro Mojica.

Aos companheiros do doutorado em Genética, Pedro Marcos, Amanda Rocha, Regina Folha, Renata Almeida, João, Antônio Campos, foi ótima a convivência.

Aos professores e colegas do Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos/Genética/UFPE, Dani, Bruno, Teresa, Jack, José Nunes, aprendi muitas coisas no convívio, deram-me grande ajuda com a produção da parte experimental com leveduras, além do carinho e amizade.

À UFPE e funcionários, agradeço através de Romildo, Nara, muita luz e paz para todos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigado aos membros da banca examinadora Prof^a Mônica Adam, Prof^a Ana Christina, Prof^a Neide Santos, Prof^a Maira Galdino que se dispuseram de seus tempos para contribuir com este trabalho. Como também a Prof^a Cláudia Rohde pelos auxílios e conselhos a melhorar este trabalho, e aos colegas que formei no laboratório do CAV/UFPE de Vitória de Santo Antão.

De todos os citados e os muitos outros espero retribuir sua amizade e apoio conquistados multiplicando as luzes que em mim foram empregadas.

Muito obrigado!

""Adeus", disse a raposa. 'E agora eu vou contar a você um segredo: nós só podemos ver perfeitamente com o coração; o que é essencial é invisível aos olhos. Os homens têm esquecido esta verdade. Mas você não deve esquecê-la. Você se torna eternamente responsável por aquilo que cativa.'"

(O Pequeno Príncipe - Saint-Exupéry, 1943).

Resumo

PT-31 [3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona] é um composto descrito com atividade analgésica e o elixir SANATIVO® (SAN e extrato de SAN, E. SAN) é um fitoterápico comum no Nordeste do Brasil. Esses produtos terapêuticos necessitam de testes adicionais antes de ter aplicabilidade humana, inclusive ensaios genéticos. Assim, dois testes de danos genéticos foram escolhidos para o presente trabalho: o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* que detecta tipos diferentes de mutações e recombinação, e mutantes de recombinação e reversão de *Saccharomyces cerevisiae*, ambos apresentam baixo custo, confiabilidade e rapidez, visando a análise genética para o uso mais seguro dos compostos. O fármaco PT-31 foi avaliado através da técnica SMART e pelo teste com os mutantes de *S. cerevisiae*; com o elixir SANATIVO® foi formada uma curva de sobrevivência larval utilizando os dois tipos de cruzamentos (ST e HB) do SMART, em seguida este ensaio foi empregado; e o extrato de SAN foi analisado pelo SMART e através das linhagens de *S. cerevisiae*. Notou-se a possibilidade de SAN ter reduzido a toxicidade do álcool por meio da sobrevivência larval. Enquanto que o SMART de SAN e de E. SAN revelou efeito mutagênico na maioria das concentrações testadas, com ativação metabólica e efeito recombinogênico ausentes, sem alteração identificável nos testes em *S. cerevisiae*. O PT-31 mostrou efeito mutagênico e atividade recombinogênica no teste SMART, aumentando o efeito mutagênico pela atividade metabólica do sistema P450, e nenhuma alteração fenotípica no teste em *S. cerevisiae*. Esses dados contribuem para a ampliação das informações sobre os compostos terapêuticos na literatura, para que futuros experimentos possam elucidar melhor a ação em organismos vivos.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*. *Saccharomyces cerevisiae*. Mutagênese. Compostos terapêuticos.

Abstract

PT-31 [3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione] is a compound described with analgesic activity and SANATIVO® elixir (SAN e SAN extract, E. SAN) is a common phytotherapeutic in the Northeast of Brazil. Those therapeutic products require additional tests before human applicability, including genetic assays. The Mutation and recombination Somatic Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* provides different sorts of mutations and recombination, and recombination and reversion mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, both present low cost, reliability and speed, in order the genetic analysis for a safer use of the compounds. The PT-31 drug was evaluated by SMART technique and by the test with *S. cerevisiae* mutants; with the SANATIVO® elixir was constructed a larval survival curve using two types of crosses (ST and HB) of SMART, then this assay was used; and the SAN extract was assessed by SMART and by *S. cerevisiae* strains. It was noticed the possibility of SAN have reduced toxicity of the alcohol by larval survival. While the SMART of SAN and of E. SAN revealed mutagenic effect in most of the tested concentrations, with metabolic activation and absent recombinogenic effect, without identifiable modification in the tests in *S. cerevisiae*. The PT-31 showed mutagenic effect and recombinogenic activity in the SMART test, increasing of mutagenic effect by the metabolic activity of P450 system, and none phenotypic change in the test in *S. cerevisiae*. These data contribute to the expansion of information on the therapeutic compounds in the literature, so that future experiments will be able to elucidate the action in living organisms.

Keywords: *Drosophila melanogaster*. *Saccharomyces cerevisiae*. Mutagenesis. Therapeutic compounds.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Modelo estrutural dos compostos PT-31 (à esquerda) e clonidina (à direita).....	18
Figura 2 - Possível mecanismo de interação do PT-31 com motivos de alfa-hélice de proteínas alvo em humanos.....	18
Figura 3 - Pêlos das asas de <i>D. melanogaster</i> (Tricomas). A – normais; B – <i>multiple wing hairs (mwh)</i> ; C - <i>flare³ (flr³)</i> ; D – gêmeos: <i>mwh</i> e <i>flare³ (flr³)</i>	24
Figura 4 - Asas de <i>Drosophila melanogaster</i> fenotipicamente selvagens (A) e serrilhadas (B).....	25
Figura 5 - Tratamento de leveduras com a droga PT-31. Meio YPD com as linhagens de levedura, respectivamente, 1, BY4742; 2, $\Delta rad1$; 3, $\Delta rad10$; 4, $\Delta rad52$; 5, $\Delta rev7$; 6, $\Delta rev1$ e 7, BY4741, nos diferentes tempos: T0, 0 hora; T1, 1 hora; T2, 3 horas e T3, 24 horas. Os tratamentos foram A, água ultradestilada (controle negativo - CN); B, solução de PT-31 e C, MMS (controle positivo - CP).....	41
Figura 6 - Tratamento da linhagem MM10–2a de levedura com a droga PT-31. Meio YNB com a linhagem de levedura MM10–2a e os tratamentos CN, água ultradestilada; CP, MMS e PT-31 nos diferentes tempos: T0, 0 hora; T1, 1 hora; T2, 3 horas e T3, 24 horas. As setas indicam os tratamentos de PT-31, os únicos que formaram colônias...	42
Figura 7 - Tratamento de leveduras com a solução de E. SAN. Meio YPD com as linhagens de levedura, respectivamente, 1, BY4742; 2, $\Delta rad1$; 3, $\Delta rad10$; 4, $\Delta rad52$; 5, $\Delta rev7$; 6, $\Delta rev1$ e 7, BY4741, nos diferentes tempos: T0, 0 hora; T1, 1 hora; T2, 3 horas e T3, 24 horas. Os tratamentos foram A, água ultradestilada (controle negativo - CN); B, solução de E. SAN e C, MMS (controle positivo - CP).....	52
Figura 8 - Tratamento da linhagem MM10–2a de levedura com a solução de E. SAN. Meio YNB com a linhagem de levedura MM10–2a e os tratamentos CN, água ultradestilada; CP, MMS e PT-31 nos diferentes tempos: T0, 0 hora; T1, 1 hora; T2, 3 horas e T3, 24 horas.....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Frequência de manchas mutantes obtidas do Cruzamento de Padrão (ST) do SMART, indivíduos heterozigotos marcados (MH - <i>mwh/flr³</i>) e heterozigotos balanceados (<i>mwh/TM3</i>). Tratamento crônico larvar com concentrações de PT-31 (7,5, 3,75, 1,875, 0,94, 0,47, 0, 234 e 0,117 mg/ mL), controle negativo (água ultradestilada) e controle positivo de (Doxorrubicina - DXR 0,125mg/mL)....	38
Tabela 2 - Frequência de manchas mutantes obtidas do Cruzamento de Alta Bioativação (HB) do SMART, indivíduos heterozigotos marcados (MH - <i>mwh/flr³</i>) e heterozigotos balanceados (<i>mwh/TM3</i>). Tratamento crônico larvar com concentrações de PT-31 (7,5, 3,75, 1,875, 0,94, 0,47, 0, 234 e 0,117 mg/ mL), controle negativo (água ultradestilada) e controle positivo de (Doxorrubicina - DXR 0,125mg/mL).....	39
Tabela 3 - Sobrevivência média de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> dos cruzamentos ST e HB.....	43
Tabela 4 - Frequência de manchas mutantes obtidas do Cruzamento de Padrão (ST) do SMART, indivíduos heterozigotos marcados (MH - <i>mwh/flr³</i>) e heterozigotos balanceados (<i>mwh/TM3</i>). Tratamento crônico larvar com concentrações de Sanativo® (SAN 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0313, 0,0156 e 0,0078 mL/ mL), controle negativo (água ultradestilada) e controle positivo de (Doxorrubicina - DXR 0,125mg/mL).....	46
Tabela 5 - Frequência de manchas mutantes obtidas do Cruzamento de Alta Bioativação (HB) do SMART, indivíduos heterozigotos marcados (MH - <i>mwh/flr³</i>) e heterozigotos balanceados (<i>mwh/TM3</i>). Tratamento crônico larvar com concentrações de Sanativo® (SAN 0,25, 0,125, 0,0625 e 0,0156 mL/ mL), controle negativo (água ultradestilada) e controle positivo de (Doxorrubicina - DXR 0,125mg/mL).....	47
Tabela 6 - Frequência de manchas mutantes obtidas do Cruzamento de Padrão (ST) do SMART, indivíduos heterozigotos marcados (MH - <i>mwh/flr³</i>) e heterozigotos balanceados (<i>mwh/TM3</i>). Tratamento crônico larvar com concentrações de extrato de Sanativo® (E. SAN 28,92, E. SAN 14,46, E. SAN 7,23, E. SAN 3,615, E. SAN 1,81, E. SAN 0,904 e E. SAN 0,452 mg/ mL), controle negativo (água ultradestilada) e controle positivo de	

(Doxorrubicina - DXR 0,125mg/mL)..... 49

Tabela 7 - Frequência de manchas mutantes obtidas do Cruzamento de Alta Bioativação (HB) do SMART, indivíduos heterozigotos marcados (MH - *mwh/flr*³) e heterozigotos balanceados (*mwh/TM3*). Tratamento crônico larvar com concentrações de extrato de Sanativo® (E. SAN 28,92, E. SAN 14,46, E. SAN 7,23, E. SAN 3,615, E. SAN 1,81, E. SAN 0,904 e E. SAN 0,452 mg/ mL), controle negativo (água ultradestilada) e controle positivo de (Doxorrubicina - DXR 0,125mg/mL)..... 50

Lista de Abreviaturas

BH	- Heterozigoto balanceado (<i>mwh</i> + / + TM3, BdS)
BY4741 BY4742	e - Linhagens selvagens de leveduras
CP	- Controle Positivo
CN	- Controle Negativo
CV%	- Coeficiente de Variação em %
DMS	- Diferença Mínima Significativa
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DXR	- Doxorrubicina
E SAN	- Extrato de SANATIVO®
ETA 1	- Etanol a 25° GL
ETA 2	- Etanol a 50° GL
<i>flr3</i>	- flare3 (<i>flr</i> ³) (<i>flr</i> ³ / <i>ln</i> (3LR)TM3, <i>ri pp sep l</i> (3)89Aa <i>bx</i> ^{34e} e <i>Bd</i> ^S)
HB	- Cruzamento de alta bioativação
HR	- Homologous recombination (recombinação homóloga)
MG	- Média Geral
MH	- Heterozigoto marcado (<i>mwh</i> + / + <i>flr</i> ³)
MM10-2a	- Linhagem de levedura auxotrófica à lisina
MMS	- Metil metanossulfonato
MSG	- Mancha Simples Grande
MSP	- Mancha Simples Pequena
<i>Mwh</i>	- <i>multiple wing hair</i> (<i>mwh</i>): <i>y</i> ; <i>mwh j</i>
<i>mwh/flr</i> ³	- Indivíduo heterozigoto marcado
<i>mwh/TM3</i>	- Indivíduo heterozigoto balanceado

ORR;flr3	- Oregon R, <i>flare3</i> (ORR/ORR; <i>flr</i> ³ /ln(3LR)TM3, <i>ri pp sep l(3)89Aa bx</i> ^{34e} e <i>Bd</i> ^S)
PT-31	- [3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona]
RAD 1- RAD 52	- Genes de reparo recombinacional
REV 1, REV 3 e REV 7	- Genes de reparo por reversão
SAN	- SANATIVO®
SMART	- Teste de Mutação e Recombinação Somática
ST	- Cruzamento padrão
TM	- Total de Manchas
YPD	- Meio de crescimento de levedura completo
YNB	- Meio de crescimento de leveduras sem aminoácidos

Sumário

1 Introdução.....	15
2 Revisão da Literatura.....	17
2.1 O composto PT-31 e seu uso potencial em saúde humana.....	17
2.2 Elixir SANATIVO®.....	19
2.3 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2.4 Mutantes de recombinação e reversão de leveduras.....	26
3 Objetivos.....	30
4 Material e Métodos.....	31
5 Resultados.....	37
6 Discussão.....	54
7 Conclusões.....	62
Referências.....	63
Apêndice A - The new analgesic compound PT-31 (3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione) exhibits recombinogenic activity in <i>Drosophila melanogaster</i> SMART.....	71
Apêndice B - Submissão do manuscrito à Revista Mutation Research.....	91

1 Introdução

A substância PT-31 (3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona) é um derivado imidazólico que apresenta função analgésica em modelos experimentais em cirurgia e para terapia de dor. Diferente deste, o elixir SANATIVO® é um fitoterápico de composição pouco conhecida e variável, muito usado na região do Nordeste do Brasil para o combate a infecções tópicas. Em ambos os casos os efeitos genotóxicos ainda são pouco conhecidos. Como qualquer produto terapêutico, esses compostos necessitam de testes prévios que comprovem sua segurança, antes de sua aplicação em humanos. Entre os testes de aplicabilidade estão os de mutagênese.

Ensaio de mutagênese são comumente empregados para investigar os possíveis efeitos de substâncias químicas com potencial de induzir mutações. Há diversos tipos de ensaios utilizando como modelo linhagens de bactérias, leveduras, plantas, moscas, camundongos e ratos, cada um apresentando vantagens e aplicabilidades específicas. O Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) emprega linhagens especiais da mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) nas quais é possível observar diferentes tipos de mutações e ainda recombinação que ocorrem nas células das asas. O teste com linhagens mutantes de levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta genes envolvidos nos mecanismos de reparo de danos genéticos, sendo, portando, marcadores que indicam indução de mutação. A utilização deste organismo representa um modelo eucariótico adicional ao teste com *D. melanogaster*, utilizados no presente estudo.

Desta forma, a finalidade do estudo é avaliar o potencial mutagênico, recombinogênico e reversão de diferentes concentrações dos compostos terapêuticos PT-31 e do elixir SANATIVO®, se esses produtos sofrem ativação metabólica, empregando dois modelos biológicos. O estudo foi dividido em três etapas: 1) o fármaco PT-31 foi avaliado através da técnica SMART e do teste com os mutantes de *S. cerevisiae*; 2) o elixir SANATIVO® foi empregado para a formação de uma curva de sobrevivência larval por meio dos dois tipos de cruzamentos (ST e HB) do SMART e em seguida foi realizado o teste SMART do composto e 3) o extrato de SAN foi analisado pelo SMART e através das linhagens de *S. cerevisiae*. Os resultados obtidos nos testes de cada tratamento auxiliarão no esclarecimento

dos efeitos biológicos destes compostos, adicionando informações importantes à escassa literatura, contribuindo com pesquisas futuras para traçar o perfil de segurança da sua aplicabilidade em humanos.

2 Revisão de Literatura

2.1 O composto PT-31 e seu uso potencial em saúde humana

Os componentes imidazoles, têm atraído a atenção de químicos medicinais por suas altas propriedades terapêuticas (Abdel-Wahab et al., 2011). Esses compostos podem ser sintetizados (Nii et al., 2008), ou comumente encontrados em fármacos e produtos naturais (Alzieu et al., 2014). Têm ampla gama de propriedades medicinais, por exemplo, anticâncer, antimicrobial, antibacterial, antifungal, antioxidante (Abdel-Wahab et al., 2011).

Imidazole é um composto aromático heterocíclico simples, cujo anel está presente na estrutura de muitos componentes orgânicos. Solúvel em etanol, clorofórmio, éter etílico, piridina e água, quando administrado de forma oral é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal. Dentro do corpo, essa molécula é metabolizada à hidantoina e, subsequentemente, a ácido hidantóico, que podem ser eliminados na urina. Compostos imidazoles foram avaliados quanto à mutagenicidade por meio do teste Ames, onde todos obtiveram respostas negativas (Forster et al., 1992). Dentro desta categoria, as imidazolidinas são grupos de compostos heterocíclicos, que são formados através da adição de quatro átomos de hidrogênio ao anel imidazol (Arduengo et al., 1992), onde se encontra o PT-31 (3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona) (Sudo et al., 2010).

PT-31 foi desenvolvido como um novo composto similar à clonidina (Figura 1) que produz efeitos antinociceptivos dose-dependentes como agonista α_2 -adrenoceptor que pode representar importante desenvolvimento na medicina (Sudo et al., 2010), devido apresentar algumas propriedades como atividade analgésica, sedativa e adjuvante de anestésicos (Pitta, 2008). O efeito antinociceptivo foi demonstrado em camundongos, através da administração intraperitoneal, em efeito sinérgico com a morfina. A potência e intensidade do PT-31 foi mais baixa do que da morfina, entretanto a combinação de ambas as drogas potencializa a atividade devido a um sinergismo, pois o efeito da combinação (ou associação) é superior àquele esperado (Figura 2, a interação de PT-31 com resíduo de ILE-190 da molécula-alvo). As propriedades do PT-31 o tornam clinicamente relevante em cirurgia e terapia da dor (Sudo et al., 2010).

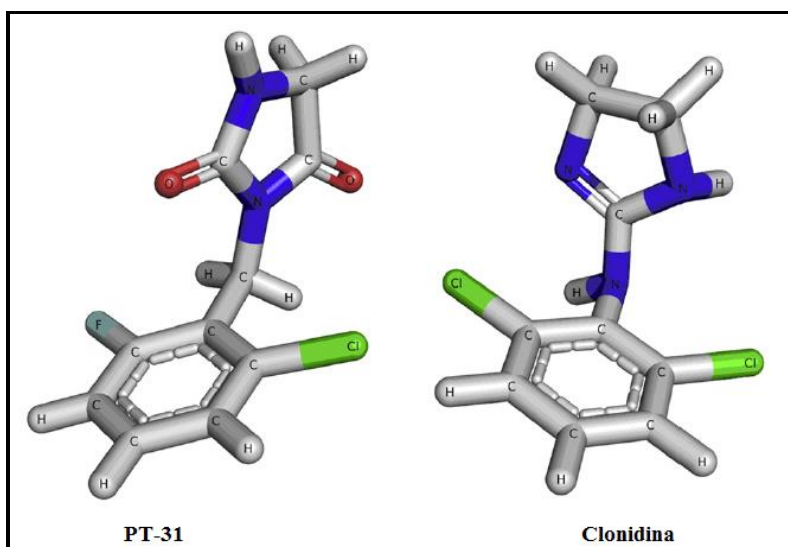


Figura 1. Modelo estrutural dos compostos PT-31 (à esquerda) e clonidina (à direita). Adaptado de Sudo et al (2010).

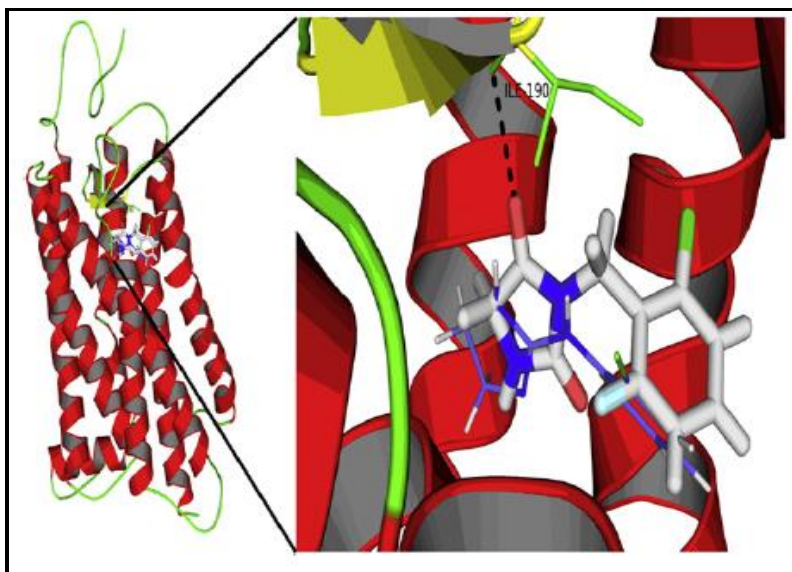


Figura 2. Possível mecanismo de interação do PT-31 com motivos de alfa-hélice de proteínas alvo em humanos. Adaptado de Sudo et al (2010).

O estudo de genotoxicidade de PT-31 é importante, pois o fármaco tem possível aplicação dentro da terapêutica em humanos, além disso, porque seus mecanismos não são totalmente conhecidos. Alguma compreensão pode ser tirada dos estudos dos compostos imidazoles. Por exemplo, fármacos que possuem o anel

imidazol são relatados tendo uma ampla atividade na medicina clínica, como anticâncer, antimicrobial, antibacterial, antifungal, antioxidante (Abdel-Wahab et al., 2011). Enquanto outros compostos como climbazole não apresentaram risco de genotoxicidade ou carcinogenicidade em humanos (Pérez-Rivera 2009).

Em *Drosophila melanogaster*, foram avaliados cinco herbicidas análogos, que contêm anel imidazole. O SMART destes compostos classificados como herbicidas imidazolinonas (IMI), verificou que três (imazapir, imazapic e imazetapir) tiveram resultados genotóxicos negativos, enquanto que imazamox e imazaquin apresentaram resultados positivos (manchas grandes simples e fraco resultado positivo para manchas totais), principalmente devido à recombinação induzida (Fragiorge et al., 2008). Testes com outros compostos que contêm imidazole também podem ser encontrados na literatura, apresentando diferentes resultados. Isso é possível porque o anel imidazolidínico (compostos heterocíclicos modificados do anel imidazol) pode ter modificações na estrutura que podem alterar suas propriedades físico-químicas e efeitos biológicos (Pitta et al., 2006). Enquanto que o analgésico PT-31, que contém esses compostos, apenas o estudo de genotoxicidade realizado por Lucio Neto (2011) é conhecido.

2.2 Elixir SANATIVO®

O elixir SANATIVO® (SAN) é um dos mais antigos fitoterápicos do mercado Brasileiro, cuja utilização data de 1888 (Azoubel e Ribeiro, 2013). Este é produzido pela empresa Laperti e usado tradicionalmente na região nordeste do Brasil para o tratamento de feridas, inflamações e tecidos lesionados. Corresponde a um extrato hidroalcolico de diferentes espécies de plantas como 20% de angico (*Piptadenia colubrina*, Benth), 20% de aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Raddi), 1,7% de camapu (*Physalis angulata*, Linné) e 1,7% do mandacaru (*Cereus peruvianus*, Miller) (Lima et al, 2006).

Dentre as plantas que compõem o elixir, existem testes realizados com extratos de angico, mostrando efeito bactericida (Weber Sobrinho, 2010; Araújo, 2013), embora não tenha sido observada atividade mutagênica em eritrócitos de roedores (Araújo, 2013). O extrato da casca do caule de *Schinus terebinthifolius* (aroeira), por sua vez, produz danos no DNA e mutação em bactérias (Carvalho et

al., 2003), enquanto o extrato de *Physalis angulata* (camapu) se apresentou como indutor de efeitos genotóxicos em linfócitos humanos *in vitro* (Santos et al., 2008). Entretanto, não existem estudos com os testes SMART e testes em *Saccharomyces cerevisiae* para estas plantas, como também não há análise de Sanativo® com estes modelos na literatura científica.

2.3 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*

Células eucarióticas estão expostas tanto a danos endógenos quanto a exógenos nos seus genomas (Lok e Powell, 2012), de forma que uma alteração generalizada do DNA genômico é um marco de tumores, onde a alteração de genes envolvidos na manutenção do DNA contribui para o processo de formação de tumores (Marakumo et al., 2000). Também diferentes formas de câncer e desenvolvimento de doenças podem ser formadas por mutações e alterações cromossômicas somáticas e/ou germinativas (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Existem evidências que alguns processos genéticos são responsáveis pela geração de câncer, neste âmbito se inclui a recombinação homóloga (HR). Processos como alterações genéticas podem produzir células que contornam restrições do crescimento normal devido a mutações em proto-oncogenes, como também neste caso há evidências da relação de HR em células proliferativas e uma forma alternativa que muitas vezes é um evento de uma perda de heterozigossidade (basicamente resulta da perda de um determinado alelo de uma célula que é então tanto homozigótico ou hemizigótico para o alelo remanecente) (Bishop e Schiestl, 2002). A indução de perda de heterozigossidade pode ser em algum momento um passo à carcinogênese, como pode também produzir genes suscetíveis a ação de genotóxicos químicos ou viroses tumorais (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Graf et al., 1996).

A fim de analisar genotóxicos químicos, alguns ensaios são utilizados (Sharma et al., 2011). São diversos testes de avaliação de segurança, como testes de toxicidade, testes de carcinogênese, testes de mutagênese, testes de neurotoxicidade, testes de imunotoxicidade (Varanda, 2006; Maenosono et al., 2007). Pois apesar de muitos compostos com atividades biológicas serem

conhecidos, muitos deles não podem ser usados na terapêutica devido às propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas. Devem ser definidos os parâmetros de segurança e eficácia, e estudos adicionais *in vitro* como *in vivo* podem ser feitos antes de comercializar o produto (Katzung et al., 2012) no intuito de se evitar danos ao DNA humano, prevenir instabilidade genética, e consequentemente, o câncer (Lucio Neto, 2011).

Assim, testes com modelos como camundongos e ratos são muito empregados, entretanto atualmente em pesquisa biológica modelos animais alternativos estão ganhando mais ênfase (Sharma et al., 2011). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda o teste com *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* para análises de mutações gênicas, e testes com células hematopoiéticas de roedores (micronúcleo) na avaliação de alterações cromossômicas (ANVISA, 2013). Dentre outros testes, o Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos de teste (ECVAM) tem recomendado pesquisas toxicológicas com organismos como *Drosophila melanogaster*, o ensaio SMART - Somatic Mutation and Recombination Test (Teste para detecção de Mutação Somática e Recombinação) utiliza este organismo na avaliação de genotoxicidade de diversos compostos (Sharma et al., 2011).

O SMART é uma técnica que permite detectar indiretamente mutações de ponto, deleções, alterações cromossômicas (como perda cromossômica e não-disjunção), recombinação mitótica e conversão de gene; como também pode detectar a ativação de promutágenos (compostos com capacidade de transformar carcinógenos em seus metabólitos ativos) (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Graf et al., 1998; Idaomar et al. 2002). Esse teste foi desenvolvido para detectar perda de heterozigosidade de marcadores de gene disponíveis para determinar fenótipos expressos nos olhos ou nas asas das moscas (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Graf et al., 1998). O teste foi usado por mais de 50 anos para se identificar produtos carcinogênicos e estudar alguns dos seus mecanismos de ação (Idaomar et al. 2002).

Além das características descritas, o bioensaio SMART apresenta vantagens como a escolha do organismo modelo, *Drosophila melanogaster* (Guzmán-Rincón e Graf, 1995) e a possível avaliação de forma rápida da habilidade de diversos mutágenos candidatos (Cunha et al., 2001). Esse teste se apresenta como sensível,

rápido e barato que detecta ação de químicos mutagênicos, recombinogênicos e anti-mutagênicos (Rand, 2010).

O uso da *Drosophila melanogaster* como espécie modelo de laboratório apresenta diversas características vantajosas como: organismo modelo de estudos de Genética; seus cromossomos politênicos das glândulas salivares permite diversos métodos de hibridização; permite compreender estudos de genômica, proteômica, bioinformática e molecular funcional; manipulação e monitoramento de genes do curso do desenvolvimento; estudos de neurobiologia, neurotoxicologia e drosotoxicologia; estudos de mutagênese (Rand, 2010); desenvolvimento rápido e aplicável para detecção de substâncias com potenciais genotóxicos; curto período de geração (aproximadamente 10 dias a 25°C); detêm fáceis caracteres geneticamente detectáveis controlados morfologicamente; vasto número de mutantes e linhagens caracterizadas geneticamente; seu meio de cultura é bem diminuto, mas permite que as moscas se cruzem; capaz de ativação enzimática de promutágenos e procarcinógenos *in vivo*. (Graf et al., 1996; Guzmán-Rincón e Graf, 1995). No teste SMART as larvas se alimentam de comida misturada a droga de interesse, sendo possível a avaliação dos seus efeitos (Sharma et al., 2011).

Outro fator importante é que as drosófilas possuem extensa homologia genética com os mamíferos (Arossi et al., 2009). No que se refere aos aspectos humanos, seu estudo é de extremo interesse também porque esses indivíduos têm alto nível de conservação em diversos aspectos, de domínios individuais e proteínas como em complexos inteiros e rotas de várias etapas bioquímicas (Cunha et al., 2001). Mais recentemente, o projeto de sequenciamento do genoma de drosófila revelou que metade das sequências protéicas identificadas expressam similaridade às proteínas de mamíferos. As moscas apresentam, adicionalmente, uma ortologia de 61% dos genes de doenças humanas e 68% dos genes que controlam cânceres. O teste de manchas de asas em *Drosophila* da técnica SMART está entre os testes de genotoxicidade mais usados com essa mosca (Idaomar et al. 2002).

O ensaio SMART pode ser montado em apenas uma única geração de moscas (aproximadamente 10 dias) ao contrário de testes clássicos para recessivos letais *sex-linked* em células germinativas em duas ou mais gerações (Graf et al., 1998; Rand, 2010). O ensaio possui vantagem adicional que fazem da mosca das frutas *Drosophila melanogaster* uma espécie ideal também para se usar em estudos

de antigenotoxicidade, por oferecer ampla variedade e flexibilidade em protocolos para se aplicar em componentes testes. É possível realizar o cotratamento, pré e pós-tratamento simultaneamente com várias durações e também dois ou mais compostos químicos podem ser empregados na análise. Devido às vantagens o SMART se torna ensaio disponível para teste de genotoxicidade e antigenotoxicidade de agentes químicos e físicos (Graf et al., 1998; Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Dentro da técnica SMART dois sistemas testes diferentes são amplamente empregados: o teste de manchas de asas e o teste de mancha de olhos. Ambos se baseiam no fato de que durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário, grupos de células dos discos imaginais se proliferam mitoticamente no desenvolvimento larval, antes da metamorfose, em estruturas do corpo da mosca (apenas *D. melanogaster*) adulta como asas e olhos. Esses sistemas do SMART fornecem vantagem à técnica, pois expõem larga população de células que crescem mitoticamente nos discos imaginais larvais, ou seja, quando em um dos discos celulares ocorre uma alteração genética, essa alteração se fará presente em todas as células descendentes, formando clone de células mutantes (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Graf et al., 1998). Esta alteração causa uma mudança visível no fenótipo, onde os clones da célula mutante podem ser observados como uma mancha de células mutantes na superfície do corpo das moscas adultas, nos olhos ou nas asas (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Graf et al., 1998; Yüksel et al., 2010).

O SMART foi elaborado empregando dois marcadores genéticos localizados no braço esquerdo do cromossomo 3. O *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) é uma mutação recessiva mantida em homozigose que produz múltiplos tricomas por célula (Figura 3A) ao invés de único tricoma; enquanto o *flare-3* (*flr3*, 3-38,8) é uma mutação recessiva que produz pêlos malformados nas asas, apresentando o formato de uma chama (Figura 3B). O outro fenótipo é a presença também de tricomas com pelos múltiplos e pelos flare (Figura 3C), diferindo dos pelos normais (Figura 3D). Todos os alelos mutantes de *flr* são letais zigóticos recessivos, entretanto, nos discos imaginais das asas as células homozigóticas são viáveis e levam à produção de células mutantes nas asas. O alelo *flr3* é mantido em um cromossomo que possui o homólogo balanceador que carrega múltiplas inversões (teoricamente não há recombinação) e um marcador *S* dominante, que é um

homozigoto letal ($flr^3/TM3$, Bd^S : Tird Multiple 3, Beaded-Serrate). Os genótipos relevantes das três linhagens usadas são: 1) *multiple wing hairs*; 2) *flare-3*; e 3) *ORR flare-3*. A linhagem *ORR flare-3* carrega cromossomos 1 e 2 de uma linha Oregon R resistente ao DDT, caracterizada por nível aumentado de citocromo P450, o que confere sensibilidade a promutágenos e procarcinógenos, devido à alta capacidade de metabolização que transforma estas substâncias nos produtos ativos (Graf et al., 1998; Valadares et al., 2008).

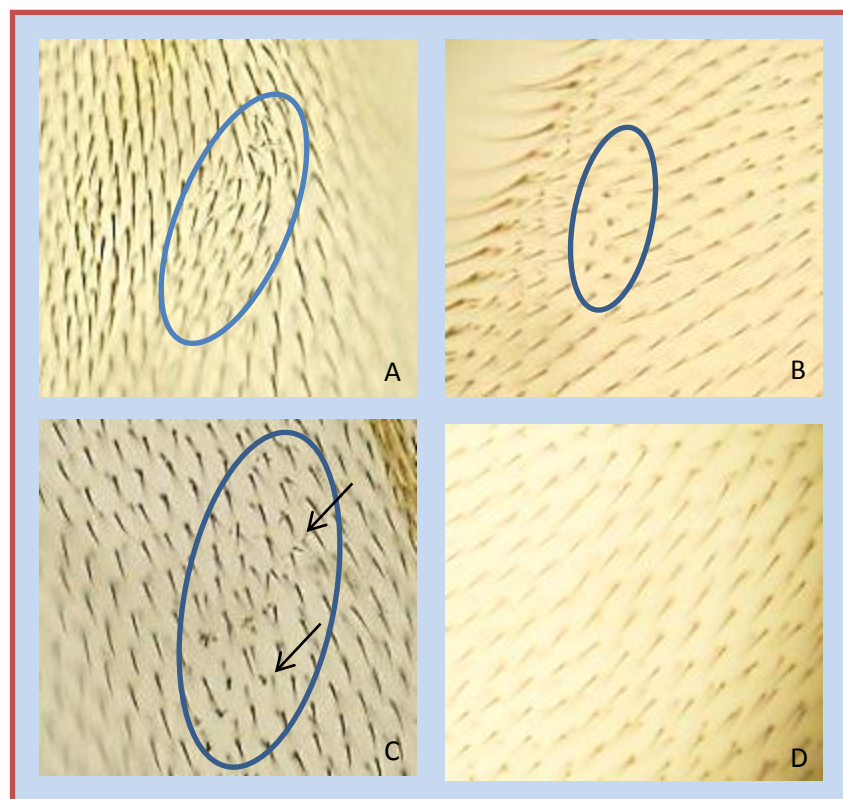


Figura 3. Pêlos das asas de *D. melanogaster* (Tricomas). A – *multiple wing hairs* (*mwh*); B – *flare³* (*flr³*); C – gêmeos: *mwh* e *flare³* (*flr³*); D – normais (Fonte: autor).

O ensaio consiste na realização de dois tipos de cruzamentos e posterior tratamento das larvas F1: o cruzamento padrão (Standard - ST) e o cruzamento de alta bioativação (HB). No cruzamento ST, fêmeas virgens *flr³* são acasaladas com machos *mwh*. No cruzamento HB, fêmeas virgem ORR são acasaladas com machos *mwh*. Ambos os cruzamentos proporcionam os seguintes descendentes F1: heterozigotos marcados (MH) com asas fenotipicamente selvagens e heterozigotos balanceados (BH) com asas fenotipicamente serrilhadas (Graf et al., 1989; Graf e Van Schaik, 1992; Valadares et al., 2008) (Figura 4). A taxa de recombinação é

calculada através das frequências de manchas mutantes nas asas dos indivíduos BH comparadas com às MH, em resultados positivos para mutação em ambos os cruzamentos ST e HB (Graf et al., 1998, Valadares et al., 2008), do contrário, só asas MH são montadas. Descendentes BH são usados desta forma por apresentarem o cromossomo balanceador TM^3Bd^S que porta múltiplas inversões, impedindo o desenvolvimento de células que tenham sofrido recombinação (Graf et al., 1998; Valadares et al., 2008).

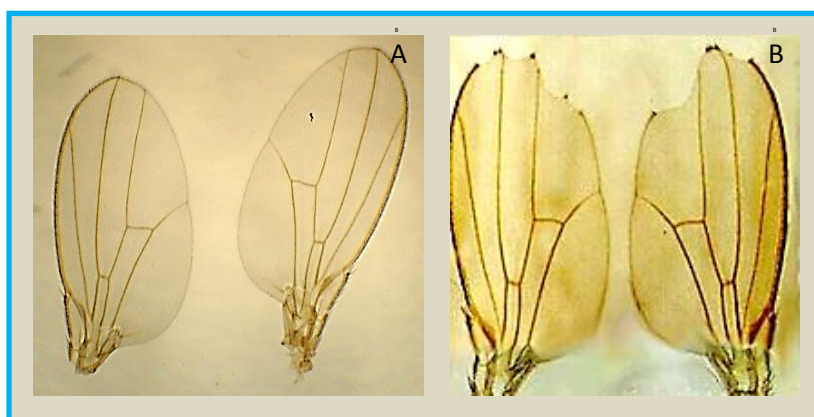


Figura 4. Asas de *Drosophila melanogaster* fenotipicamente selvagens (A) e serrilhadas (B) (Fonte: autor).

Devido ao cruzamento HB apresentar a linhagem especial ORR, com alto nível de citocromo P-450, que constitui um aspecto também importante do SMART, pois detecta xenobióticos que requerem ativação metabólica (Graf et al., 1998; Guzmán-Rincón e Graf, 1995). Desta forma é possível biotransformar certos tipos procarcinógenos em reativos metabólitos (Idaomar et al., 2002), como os promutágenos ciclofosfamida, dietilnitrosamina, 9,10-dimetilantraceno e uretano (Guzmán-Rincón e Graf, 1995). Assim, o fato de o SMART apresentar linhagem sensível a substâncias promutágenas permite obter, em vários experimentos, índices aumentados de manchas no cruzamento HB quando comparado ao ST. Além do mais, o tamanho dos clones *mwh* são mais largos com HB que no cruzamento ST, sugerindo que as larvas HB ativem promutágenos muito mais rapidamente (ou mais cedo no desenvolvimento larvar) que as ST (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Esse teste analisa atividade genotóxica de compostos de misturas simples bem como investiga genotoxicidade de misturas complexas de várias origens. Outros estudos com vários compostos são realizados: diferentes tipos de cafés, vários chás herbais, vinho, conhaque, avaliação de extratos de filtro de ar (Guzmán-Rincón e Graf, 1995), adesivos dentais (Arossi et al., 2009), bem como fármacos de tratamento psiquiátrico (Gürbuzel et al., 2012) e quimioterápicos (Danesi et al., 2012).

Por meio do SMART muitos testes investigaram também a redução dos efeitos mutagênicos e recombinogênicos de compostos, como o trióxido de cromo e raios gama, que apresentaram efeitos reduzidos após administração de vitamina C (Guzmán-Rincón e Graf, 1995). Para este caso de cotratamento, o antimutágeno age como desmutágeno, ou seja, o antimutágeno pode inativar o mutágeno quimicamente ou enzimaticamente, ou ainda inibir a ativação metabólica do promutágeno (Idaomar et al. 2002).

Esses diversos estudos mostram a vantagem do ensaio de *Drosophila* SMART não apenas como biomonitor disponível, mas também como método de avaliar impacto de possíveis mudanças ambientais (Guzmán-Rincón e Graf, 1995), investigar substâncias do consumo humano (Guzmán-Rincón e Graf, 1995), analisar atividade mutagênica e antimutagênica de diversos compostos (Idaomar et al. 2002) e pesquisar substâncias que sofrem ativação metabólica (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

2.4 Mutantes de recombinação e reversão de leveduras

Danos no DNA podem ser induzidos por uma variedade de fatores endógenos e exógenos, que incluem dano de oxigênio reativo, desaminação, perda de nucleotídeos, modificação de nucleotídeos, e quebras de fita de DNA (Murakumo et al., 2000). Assim, uma variedade de mecanismos evoluiu em células procariontes e eucariontes para remover danos no DNA e ajudar a preservar a integridade do genoma (Prakash et al., 1993), lidando com essas alterações ambientais e mutágeno-induzidas. Estudos extensivos em bactérias e leveduras foram realizados identificando componentes da maquinaria de reparo de DNA (Murakumo et al., 2000).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada também como um sistema modelo para investigação dos mecanismos responsáveis pela reparação dos danos ocorridos no DNA (Matuo et al., 2010). Com as poderosas ferramentas da genética de leveduras, esse organismo pode ser usado como modelo para demonstrar mutagênese, clonagem de DNA e terapia gênica para um avançado laboratório de biologia molecular (Marshall, 2007).

Para investigar o potencial mutagênico de químicos ou compostos existem diversos métodos, como teste de mutagenicidade com *S. cerevisiae* (Marshall, 2007), que apresenta vantagem como teste de escaneamento de curto-tempo que detecta químicos mutagênicos não envolvendo o uso de animais em laboratório (Matuo et al., 2010). *S. cerevisiae* tem sua utilização recomendada pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA, como testes que utilizam as linhagens D7 de levedura (Marshall, 2007), mas outras linhagens de leveduras põem também ser usadas (Matuo et al., 2010).

Leveduras apresentam, principalmente, o sistema de citocromo P-450 endógeno, similar a dos mamíferos, capaz de metabolizar promutágenos em compostos ativos, e são usadas no desenvolvimento de drogas e estudo de ativação metabólica de carcinógenos e xenobióticos (Matuo et al., 2010).

Agentes como radiação UV e raios-X são capazes de produzir danos no DNA. Mas há considerável evidência que, em *S. cerevisiae*, quebras de fita-dupla do DNA (Schild, 1995) ou dímeros de pirimidina induzidos por radiação UV são reparados por alguns mecanismos (Murakumo et al, 2000), como eventos de recombinação (Schild, 1995) e reparo de excisão (Prakash et al., 1993), por exemplo.

Outra causa de indução de quebras de fita-dupla do DNA é a ação do composto químico MMS (concentração de 0,5%) que pode ser letal à célula (Chlebowicz e Jachymczyk, 1979) ou mutagênica em *Saccharomyces cerevisiae* selvagem (Chi et al, 2006), a menos que as quebras sejam reparadas por mecanismo específico, cujos mutantes como *rad6* podem ter baixa habilidade de reparo (Chlebowicz e Jachymczyk, 1979). Pelo menos em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, são conhecidos mutantes que conferem sensibilidade primária a UV, alguns com sensibilidade cruzada a raios-X e MMS (Prakash e Prakash, 1977; Dong e Fasullo, 2003), em *Saccharomyces cerevisiae* alguns mutantes podem ser sensíveis, como é sensível o mutante *rad6* (Chlebowicz e Jachymczyk, 1979).

Genes no grupo *RAD 50* (*RAD50* a *57*) mediam mecanismos recombinacionais, muitos dos quais estão envolvidos na recombinação meiótica. O gene *RAD52* tem sido mostrado por muitos investigadores por ser envolvido tanto no reparo do DNA como em recombinação meiótica e mitótica (Schild, 1995). A proteína Rad52 (ScRad52) de *S. cerevisiae* foi identificada em análise genética para mutantes sensíveis a radiações ionizante e é o mediador de recombinação mais estudado, como proteína-chave na recombinação homóloga (HR) envolvido em todas as rotas de HR conhecidas. Rad52 participa do chamado grupo de epistasia, sendo que de todos os membros a ausência de Rad52 vai conferir o mais severo defeito (Lok e Powell 2012). Mutações neste gene causam sensibilidade extrema a raios-X, inabilidade de reparar quebras de fita-dupla de DNA; espontânea diminuição de mutação e recombinação mitótica induzida; esporulação e viabilidade de esporo largamente reduzidas; inabilidade de sofrer interconversão do locus de tipo-acasalamento, e perda cromossômica aumentada (Schild, 1995).

Quanto a outros mecanismo de reparo de danos genéticos, dímeros de pirimidina induzidos por radiação UV são corrigidos por reparo de excisão *RAD3*, reparo de pós-replicação *RAD6* e rotas de reparo recombinacional *RAD52*, enquanto que o reparo mutagênico de dano UV são revelados requerer genes reversíveis, *REV1*, *REV3* e *REV7*. Este último possui um complexo polimerase de contorno de lesão consistindo de uma desoxicitidil-transferase (Rev1), uma subunidade catalítica de polimerase (Rev3) e uma proteína acessória de polimerase (Rev7), complexo chamado polimerase ζ , sendo capaz de síntese de DNA translesão ao longo do sítio abásico (Murakumo et al, 2000).

Assim também, no reparo de excisão, pode ocorrer de forma que a lesão é seguida por remoção de nucleotídeos danificados, síntese de reparo da lacuna usando a fita complementar como molde, e, por fim, ligação. A análise de sensibilidade a UV de combinações duplo-mutantes entre os vários mutantes *rad* revelaram a existência de três grupos epistáticos para reparo de dano no DNA induzido por UV em *Saccharomyces cerevisiae*. *RAD3* é o proeminente membro do grupo com 11 genes conhecidos requeridos para a função, onde estão inclusos *RAD1* e *RAD10* (Prakash et al., 1993).

Pelo exposto acima, verifica-se que diferentes agentes que interagem com o DNA causam danos que são reconhecidos e reparados por diferentes mecanismos

de reparo. Desta forma, é possível se identificar a atividade genotóxica de um agente pelo tipo de mecanismo de reparo necessário para manter a viabilidade celular na presença do mutágeno. Isto abre a perspectiva para se utilizar *S. cerevisiae* como modelo para estudos de genotoxicidade, já que se pode contar com uma coleção de linhagens mutantes para cada um dos genes de seu genoma. Como exemplo dessa tecnologia, se um determinado agente promove queda na viabilidade das células de uma linhagem com mutação em um dos genes do grupo RAD52, então se conclui que os mecanismos de reparação recombinogênica atuam sobre os danos causados por aquele mutágeno, nesse caso quebras simples ou duplas do DNA.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos mutagênico, recombinogênico e de reversão ocasionados por diferentes concentrações dos compostos PT-31, SANATIVO® e extrato de SANATIVO® através do ensaio SMART em *Drosophila melanogaster* e mutantes de recombinação e reversão de leveduras.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos mutagênicos, recombinogênicos e de reversão de diferentes concentrações dos compostos PT-31 em manchas de asa de *D. melanogaster* e em linhagens específicas de leveduras.
2. Investigar os potenciais mutagênicos, recombinogênicos e reversão de concentrações de SANATIVO® por meio de linhagens específicas de leveduras e através do ensaio SMART em *D. melanogaster*.
3. Analisar os efeitos mutagênicos, recombinogênicos e reversão de concentrações de extrato de SANATIVO® através da técnica SMART e por mutantes de leveduras.
4. Comparar os resultados do ensaio SMART com o teste em leveduras da droga PT-31, do SANATIVO® e extrato de SANATIVO®, para identificar os efeitos genéticos de cada tratamento.

4 Material e métodos

4.1 Compostos empregados

4.1.1 PT-31

PT-31 é um novo composto descrito com atividade analgésica, sintetizado pelo Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (NPIT-UFPE). A preparação do PT-31 foi feita de adição gota a gota de solução de hidróxido de sódio (1,2 g, 0,03 mol) em 70% de etanol (20 mL) em uma suspensão sob agitação de imidazolidina-2,4-diona (3 g, 0,03 mol) em 70% de etanol (5 mL). Após 10 minutos, foi adicionado o radical 2-cloro-6-fluorobenzil cloreto (3,83 mL, 0,03 mol). A mistura resultante foi agitada por 5 minutos e depois mantida em repouso por 15 horas. Depois do resfriamento, o precipitado obtido foi filtrado e cristalizado com 95% de etanol, sendo purificado por cromatografia em sílica com n-hexano (Sudo et al., 2010).

Essa substância foi diluída em água nas respectivas concentrações: 7,5; 3,75; 1,875; 0,94; 0,47; 0,234 e 0,117 mg/mL (cada concentração constituiu metade da concentração anterior, sendo a concentração mais alta, inicial, 7,5 mg/mL).

4.1.2 Doxorrubicina (DXR)

O fármaco doxorrubicina (DXR) foi comprado em estabelecimento especializado, usado como controle positivo nos experimentos de mutagênese em *D. melanogaster* e na curva de sobrevivência larvar, na concentração 0,125 mg/mL. DXR foi escolhida por ser um forte agente genotóxico de ação direta, com propriedades mutagênicas, aneugênicas e clastogênicas, como também apresentou efeito recombinogênico nos experimentos de Valadares et al. (2008).

4.1.3 Metil metanossulfonato (MMS)

MMS foi adquirido comercialmente. Esse composto foi empregado como controle positivo no teste em leveduras, a concentração de 0,5%. Sabe-se que nesta

concentração há indução de quebras de DNA dupla-fita que é letal à célula, a menos que as quebras sejam reparadas por mecanismo específico, cujos mutantes como rad6 podem ter baixa habilidade de reparo (Chlebowicz e Jachymczyk, 1979). Assim, há efeito citotóxico no controle positivo (MMS 0,5%) enquanto a concentração é mutagênica em *Saccharomyces cerevisiae* selvagem (Chi et al, 2006).

4.2 Elixir Sanativo® (SAN)

A atividade mutagênica de diferentes concentrações do produto comercial Elixir Sanativo® (SAN) foi testada. O produto foi adquirido em estabelecimento comercial, e de acordo com informações do rótulo, SAN é uma solução em etanol 96°. As concentrações usadas no experimento foram diluições seriadas em água ultradestilada, partindo da primeira concentração ([1]), que é constituída pela diluição 1:1 do elixir SAN, buscando alcançar com o estudo uma média aproximada das diluições comumente usadas pela população na avaliação do composto. Desta maneira, as concentrações são as que seguem: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0313 e 0,0156 mL/mL de SAN. Assim, foi testada a atividade mutagênica das diferentes concentrações de SAN. Visando também avaliar a influência do etanol presente na solução SAN, outros controles foram realizados: controle ETA1 com etanol 50° e controle ETA 2 com etanol 25° (diluições do etanol absoluto em água ultradestilada).

Para obtenção do extrato do Sanativo® (E. SAN), foi usada a metodologia de Samad et al. (2014) modificada, que consistiu na concentração dos compostos de SAN por evaporação a vácuo (Speed Vac, Savant®) a temperatura de 50°. Foi levado em consideração a maior concentração de SAN do experimento anterior ([1] de SAN 1 apresenta em média E. SAN 28,92 mg/mL) para a montagem das diluições usadas nos tratamentos. Cada diluição apresentaram também exatamente metade da concentração da anterior, de forma que as concentrações finais foram E. SAN 28,92, E. SAN 14,46, E. SAN 7,23, E. SAN 3,615, E. SAN 1,81, E. SAN 0,904 e E. SAN 0,452 mg/ mL.

4.3 Curva de sobrevivência das larvas

Apenas as soluções das concentrações da fórmula comercial de Sanativo® (SAN) foram empregadas para a avaliação do potencial citotóxico em larvas, montando-se desta forma uma curva de sobrevivência de SAN (tabela 3). Foram usadas 100 larvas de ambos os cruzamentos ST e HB (duas repetições com 50 larvas cada), introduzidas nos vidros dos tratamentos (tratamento crônico de 48 horas) e coletados os adultos, que foram usados no teste SMART. Para a realização da curva de sobrevivência foram contabilizadas as larvas que resistiram ao tratamento e formaram pupas, bem como foram conferidos os adultos emergentes e computada uma base média de sobreviventes. O número máximo de larvas obtidos no experimento permitiu o emprego de 11 tratamentos ST (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0313 e 0,0156 mL/ mL de SAN, Doxorubicina (DXR 0,125 mg/mL), ETA 1 ETA 2 e água ultradestilada) e nove tratamentos (1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0313 mL/ mL de SAN, DXR 0,125mg/mL, ETA 1, ETA 2 e água ultradestilada), devido ao menor número de larvas HB, foram priorizadas as quatro mais altas concentrações e a quinta (intermediária entre concentrações mais extremas) para os tratamentos. Os adultos emergentes foram empregados na montagem das lâminas na técnica SMART. O teste de Tukey ao nível de 0,05 de probabilidade foi aplicado ao resultado da curva de sobrevivência, revelando a sobrevivência em alguns grupos tratados e determinando o potencial tóxico do SAN.

4.4 SMART

4.4.1 Tratamento das larvas de *D. melanogaster*

As linhagens de *D. melanogaster* usadas foram: *mwh*, flare-3 (*flr3*) e ORR (*ORR; flr3*), através da realização dos cruzamentos Padrão (ST, fêmeas virgens flare3 com machos *mwh*) e alta bioativação (HB, fêmeas virgens ORR; *flr-3* com machos *mwh*) (Graf *et al.*, 1996). Os ovos foram coletados e as larvas que eclodiram após alcançarem o 3º estágio (72 ± 4 h) foram submetidas aos tratamentos crônicos, durante 48 horas. O experimento foi realizado com tratamentos da droga em duplicata, além dos controles negativo e positivo. O controle positivo (CP) é uma

droga de comprovado efeito mutagênico, enquanto o controle negativo (CN) é geralmente o solvente da droga. Neste experimento foram feitos três testes SMART, cada um com a DXR (0,125 mg/ml) como CP e água ultradestilada como CN, enquanto que as substâncias testadas foram PT-31 (7,5; 3,75; 1,875; 0,94; 0,47; 0,234 e 0,117 mg/mL, em ambos os cruzamentos), Elixir Sanativo®, SAN (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0313 e 0,0156 mL/mL no cruzamento ST e 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0313 mL/ mL no cruzamento HB) e extrato de Sanativo®, E. SAN, (28,92; 14,46; 7,23; 3,615; 1,81; 0,904 e 0,452 mg/ mL, em ambos os cruzamentos), importante frisar que não houveram sobreviventes para a montagem dos tratamentos na concentração 1mL/mL, ETA 1 e ETA 2.

4.4.2 Confeção de lâminas e análise do material de SMART

Depois dos tratamentos, foi acompanhada a eclosão dos indivíduos adultos, que foram coletados e armazenados em etanol 70%. Posteriormente, as asas foram extraídas cuidadosamente com auxílio de lupa binocular, por meio de pinças entomológicas e colocadas pareadas em lâminas, em geral asas de cinco casais por lâmina, fixadas em glicerol e lamínulas seladas com esmalte de unhas (adaptação da fixação com solução de Faure - 30g de goma arábica, 20ml de glicerol, 50g de hidrato cloral e 50ml de água), a análise das lâminas foi em microscópio óptico (400 X), onde os padrões diferentes de manchas mutantes foram quantificados (Graf et al., 1984; Ribeiro et al., 2003). Na montagem das lâminas, os indivíduos de asas selvagens (bordas lisas – não serrilhadas, *mwh/flr³*) foram usados (heterozigotos marcados – MH), as asas serrilhadas (descendentes BH, *mwh/TM3*) foram posteriormente montadas e analisadas (heterozigotos balanceados).

Foram consideradas as moscas *mwh +/+ flare-3* que podem ter (1) manchas simples pequenas (uma ou duas células), (2) manchas simples grandes (mais que duas células) e manchas gêmeas, nos quais as manchas gêmeas podem dar alguma perspectiva de mecanismo mutagênico. É observado o aumento na frequência de manchas mutantes, no número de manchas simples pequenas e total de manchas (MSP e TM) em alguns dos grupos tratados comparados com o controle negativo. O controle positivo (DXR) revela alto número de manchas MSP, MSG (manchas simples grandes) e TM que os tratamentos, nos cruzamentos ST e HB,

pois a DXR (doxorubicina 0,125 mg/mL) é um forte componente mutagênico, que indica efeito mutagênico positivo.

As moscas *mwh* +/- TM3 apenas podem ter manchas simples *mwh*, pois nenhum evento de recombinação ocorre devido ao indivíduos possuírem cromossomo com inversões múltiplas. Os descendentes (BH) são usados no cálculo de recombinação, formado quando comparadas as frequências de clones *mwh* em MH com indivíduos BH e a diferença da frequência de clones dá a proporção de recombinação (Graf et al., 1998; Danesi et al., 2012) (percentagem obtida por meio de regra de três simples a partir das frequências de manchas totais dos tratamentos)

4.4.3 Análise estatística dos dados de SMART

A análise estatística foi feita utilizando o teste do χ^2 para proporções, bicaudal, de nível de significância $\alpha = \beta = 0,05$, de acordo com a metodologia de Frei e Würzler (1988), procedimento de múltipla decisão, que é usada para determinar se o resultado é positivo, negativo ou inconclusivo, com nível de significância de 0,05. O diagnóstico positivo foi confirmado por U-teste não-paramétrico de Wilcoxon, Mann e Whitney (Cunha et al., 2001). Esses cálculos são realizados por meio de uma programação do SMART para o Excel, em que todos os valores são obtidos.

4.5 Mutantes de recombinação e reversão de leveduras

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usadas foram as parentais BY4741 e BY4742 e seus mutantes isogênicos $\Delta rad1$ e $\Delta rad10$ (deficientes no mecanismo de excisão de nucleotídeos), $\Delta rev1$ e $\Delta rev7$ (deficientes no mecanismo de reparação mutagênica) e $\Delta rad52$ (deficientes no mecanismo de reparação recombinacional). A linhagem MM10–2A (genótipo *MATa gal- leu2-3/112 lys1-1 his7-2 trp-289 ura3-52*) foi usada como indicadora da atividade mutagênica pelo ensaio de mutação reversa no locus *lys1-1*. As sete linhagens de leveduras foram usadas no experimento de sobrevivência celular. As linhagens foram inoculadas em meio líquido YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%) e incubadas a 30° C 24 horas antes do experimento até fase exponencial ($\sim 10^7$ células/ mL), após este período, 100 μ L do pré-inóculo foram transferidos para novos frascos com água

estéril e centrifugados. Posteriormente, a água foi retirada e o sobrenadante ressuspendido em 100 μ L da solução com os tratamentos e os controles.

Foram realizados os tratamentos dos dois compostos PT-31 (7,5 mg/mL) e E. SAN (28,92 mg/mL), cada um com respectivos controles, CP (MMS 0,5%) e CN (água ultradestilada). Gotas de 5 μ L de cada cultivo foram semeadas em meio YPD (meio de cultura completo) sólido e cultivadas a 30°C, por 2 dias, para análise qualitativa. Os dados de contagem dos tratamentos e controles foram comparados observando as diferenças entre as linhagens, concentrações dos tratamentos, interações entre os compostos dos tratamentos e controles (Matuo et al., 2010). Em paralelo a este experimento, a linhagem de *S. cerevisiae* MM10-2a também foi empregada, como descrito acima, sendo por fim semeadas em meio YNB (meio instantâneo com aminoácidos, exceto lisina).

5 Resultados

5.1 Ensaio SMART de PT-31

Neste estudo foram submetidas diferentes concentrações da droga PT-31 usando linhagens modelos de *Drosophila melanogaster* para analisar os efeitos mutagênico e recombinagênico. As tabelas 1 e 2 mostram as frequências de manchas mutantes obtidas da progênie dos cruzamentos ST e HB, respectivamente, incluindo indivíduos heterozigotos marcados (MH - *mwh/flr³*) e heterozigostos balanceados (BH - *mwh/TM3*) do teste SMART de PT-31.

Tabela 1. Frequência de manchas mutantes obtidas do Cruzamento Padrão (ST) do SMART, indivíduos heterozigotos marcados (MH - *mwh/flr*³) e heterozigotos balanceados (*mwh/TM3*). Tratamento crônico larvar com concentrações de PT-31 (7,5; 3,75; 1,875; 0,94; 0,47; 0,234 e 0,117 mg/ mL), controle negativo (água ultra destilada) e controle positivo (Doxorrubicina - DXR 0,125mg/mL).

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de indiv. ^a (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^b								Recombinação (%)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^c		(>2 céls) ^c						
		<i>m</i> = 2 ^e		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2		
<i>mwh/flr</i> ³										
Água Ultradestilada	21	0,24	(05)	0,00	(00)	0,00	(00)	0,24	(05)	
PT-31 0,117	23	0,39	(09) i	0,00	(00) i	0,00	(00) i	0,39	(09) i	
PT-31 0,234	21	0,29	(06) i	0,10	(02) i	0,10	(02) i	0,48	(10) i	
PT-31 0,47	20	0,40	(08) i	0,10	(02) i	0,00	(00) i	0,50	(10) i	
PT-31 0,94	35	0,34	(12) i	0,00	(00) i	0,00	(00) i	0,34	(12) i	
PT-31 1,875	23	0,48	(11) i	0,13	(03) i	0,00	(00) i	0,61	(14) +	
PT-31 3,75	31	0,61	(19) +	0,00	(00) i	0,00	(00) i	0,61	(19) +	
PT-31 7,5	30	0,60	(18) +	0,00	(00) i	0,03	(01) i	0,63	(19) +	
DXR 0,125	76	1,87	(142) +	0,26	(20) +	0,11	(08) i	2,24	(170) +	
<i>mwh/TM3</i>										
Água Ultradestilada	26	0,31	(08)	0,00	(00)	f		0,31	(08)	g
PT-31 1,875	30	0,33	(10) i	0,00	(00) i			0,33	(10) i	
PT-31 3,75	30	0,07	(02) -	0,00	(00) i			0,07	(02) -	
PT-31 7,5	19	0,37	(07) i	0,00	(00) i			0,37	(07) i	
DXR 0,125mg/mL	69	0,77	(53) +	0,14	(10) +			0,91	(63) +	59,38

^aNúmero máximo de indivíduos obtidos para a realização do experimento. ^bEstatística segundo Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^cInclusão de manchas simples *flr*³ raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas (MG). ^eFator de multiplicação. ^fManchas gêmeas inexistentes no indivíduos *mwh/TM3*. ^gPorcentagem de recombinação entre frequência de manchas totais dos indivíduos *mwh/flr*³ e *mwh/TM3*. MSP – mancha simples pequena (*mwh* ou *flr*³ isolada uma da outra); MSG – mancha simples grande (*mwh* ou *flr*³ isolada uma da outra); TM – total de manchas. Em indivíduos *mwh/TM3* apenas manchas simples *mwh*, visto que o cromossomo balanceador *TM3* não possui o gene mutante *flr*³.

Tabela 2. Frequência de manchas mutantes obtidas do Cruzamento de Alta Bioativação (HB) do SMART, indivíduos heterozigotos marcados (MH - *mwh/flr*³) e heterozigotos balanceados (*mwh/TM3*). Tratamento crônico larvar com concentrações de PT-31 (7,5; 3,75; 1,875; 0,94; 0,47; 0,234 e 0,117 mg/ mL), controle negativo (água ultra destilada) e controle positivo (Doxorrubicina - DXR 0,125mg/mL).

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de indiv. ^a (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^b								Recombinação (%)	
		MSP		MSG		MG		TM			
		(1-2 céls) ^c <i>m</i> = 2 ^e		(>2 céls) ^c <i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2			
<i>mwh/flr</i> ³											
Água Ultradestilada	16	0,56	(09)		0,00	(00)		0,00	(00)	0,56 (09)	
PT-31 0,117	16	0,63	(10)	i	0,13	(02)	i	0,00	(00)	0,75 (12)	i
PT-31 0,234	22	0,82	(18)	i	0,09	(02)	i	0,00	(00)	0,91 (20)	i
PT-31 0,47	11	0,55	(06)	i	0,00	(00)	i	0,00	(00)	0,55 (06)	i
PT-31 0,94	14	1,14	(16)	i	0,00	(00)	i	0,00	(00)	1,14 (16)	i
PT-31 1,875	22	1,00	(22)	i	0,14	(03)	i	0,00	(00)	1,14 (25)	+
PT-31 3,75	19	0,84	(16)	i	0,11	(02)	i	0,00	(00)	0,95 (18)	i
PT-31 7,5	15	1,47	(22)	+	0,00	(00)	i	0,07	(01)	1,53 (23)	+
DXR 0,125	59	2,32	(137)	+	0,37	(22)	+	0,07	(04)	2,76 (163)	+
<i>mwh/TM3</i>											
Água Ultradestilada	28	0,25	(07)		0,00	(00)		^f		0,25 (07)	^g
PT-31 1,875	18	0,61	(11)	+	0,00	(00)	i			0,61 (11)	+
PT-31 7,5	11	1,18	(13)	+	0,00	(00)	i			1,18 (13)	+
DXR 0,125	45	0,58	(26)	+	0,27	(12)	+			0,84 (38)	+

^aNúmero máximo de indivíduos obtidos para a realização do experimento. ^bEstatística segundo Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^cInclusão de manchas simples *flr*³ raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas (MG). ^eFator de multiplicação. ^fManchas gêmeas inexistentes no indivíduos *mwh/TM3*. ^gPorcentagem de recombinação entre frequência de manchas totais dos indivíduos *mwh/flr*³ e *mwh/TM3*. MSP – mancha simples pequena (*mwh* ou *flr*³ isolada uma da outra); MSG – mancha simples grande (*mwh* ou *flr*³ isolada uma da outra); TM – total de manchas. Em indivíduos *mwh/TM3* apenas manchas simples *mwh*, visto que o cromossomo balanceador *TM3* não possui o gene mutante *flr*³.

Ambas as tabelas, 1 e 2, o controle positivo (DXR) revelou resultado positivo para os tipos de manchas MSP, MSG e TM; por outro lado, o controle negativo (água ultra destilada), apresentou os mais baixos resultados em todas as frequências de manchas, corroborando a viabilidade do experimento. Em relação aos grupos tratados, a tabela 1 mostra as concentrações que dispõe de aumento estatístico significativo no número de manchas. De todas as sete concentrações de PT-31 presentes em asas heterozigotas marcadas (*mwh/flr*³), 7,5; 3,75 e 1,875 revelam resultados positivos no total de manchas (TM), destas, a mais alta concentração e a sucessora foram também significativas para o número MSP. Para o resultado de recombinação obtido pelo seguinte emprego dos indivíduos heterozigotos balanceados (*mwh/TM3*), o dado estatisticamente positivo foi a porcentagem de 59,38% da DXR, este se revelou significativo em todos os tipos de manchas possíveis dos indivíduos *mwh/TM3*.

A observação da tabela 2 (cruzamento HB) traz uma perspectiva diferente do cruzamento ST. Os resultados de manchas simples pequenas e total de manchas (MSP e TM) estão presentes, nos indivíduos *mwh/flr*³, também estatisticamente significativos, mas se observou que a frequência e o número de manchas foram maiores nos tratamentos do cruzamento HB que nos do ST, aumentando os valores neste primeiro. Analisando a frequência aumentada de manchas mutantes delas, as concentrações 7,5 e 1,875 de PT-31 têm frequência aumentada de TM, a mais alta destas também apresentou resultado positivo para MSP. A DXR revelou 69,57% de atividade recombinogênica, enquanto as concentrações 7,5 e 1,875 de PT-31 foram de 22,87 e 46,49%, respectivamente.

5.2 Análise de PT-31 em leveduras

Esta parte experimental constitui a continuidade do teste de mutagênese. Entretanto, aqui, uma única concentração da droga PT-31 (a mais alta, 7,5 mg/mL) foi empregada em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, para analisar os efeitos mutagênico, recombinogênico e reversão. Como pode ser observado na figura 5, há o esquema de fotos das culturas das sete linhagens de leveduras (BY4741, BY4742, $\Delta rad1$, $\Delta rad10$, $\Delta rev1$, $\Delta rev7$ e $\Delta rad52$), apresentando a viabilidade das colônias frente à concentração de 7,5 mg/mL de PT-31. A figura 6

mostra as placas de YNB (suplementado com aminoácidos, exceto lisina) onde a linhagem MM10-2a foi cultivada, com os respectivos controles e tratamento (PT-31), revelando algumas colônias.

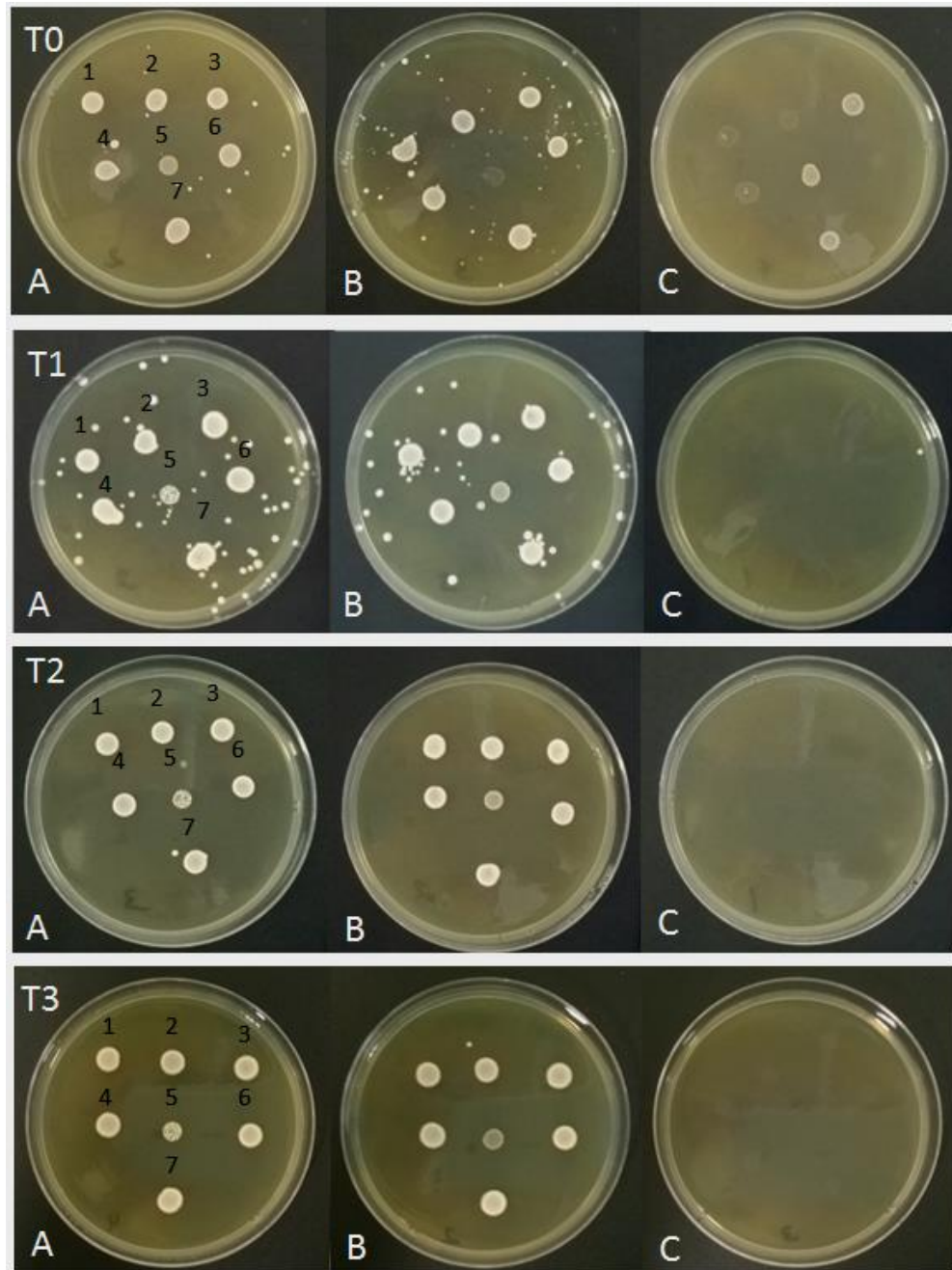


Figura 5. Tratamento de leveduras com a droga PT-31. Meio YPD com as linhagens de levedura, respectivamente, 1, BY4742; 2, $\Delta rad1$; 3, $\Delta rad10$; 4, $\Delta rad52$; 5, $\Delta rev7$; 6, $\Delta rev1$ e 7, BY4741, nos diferentes tempos: T0, 0 hora; T1, 1 hora; T2, 3 horas e T3, 24 horas. Os tratamentos foram A, água ultradestilada (controle negativo - CN); B, solução de PT-31 e C, MMS (controle positivo - CP) (Fonte: do autor, 2014).

Na figura 5, é possível observar a formação de colônias de leveduras usadas na análise qualitativa do experimento. Os controles foram efetivos; no CN (água

ultradestilada), houve formação de colônias aparentemente de tamanhos semelhantes (figura 5 – coluna A) em todos os tempos testados (T0 a T3), exceto a linhagem $\Delta rev7$ (5) que possui crescimento celular mais lento que as demais; no CP (MMS 0,5%), induziu-se mutação/citotoxicidade, demonstrado em todos os intervalos (T0 a T3 - visualize as três colônias resistentes em T0). No experimento, o tratamento com a solução de PT-31 obteve visual semelhante ao do CN, inclusive com as colônias da linhagem $\Delta rev7$ em tamanhos reduzidos. Por outro lado, na figura 6, a formação de colônias de MM10-2a dos tratamentos de PT-31 nos intervalos de T1 a T3 indica possível mutação, favorecendo a sobrevivência da linhagem no meio sem o aminoácido lisina, como se observa, a mutação é ausente nos controles.

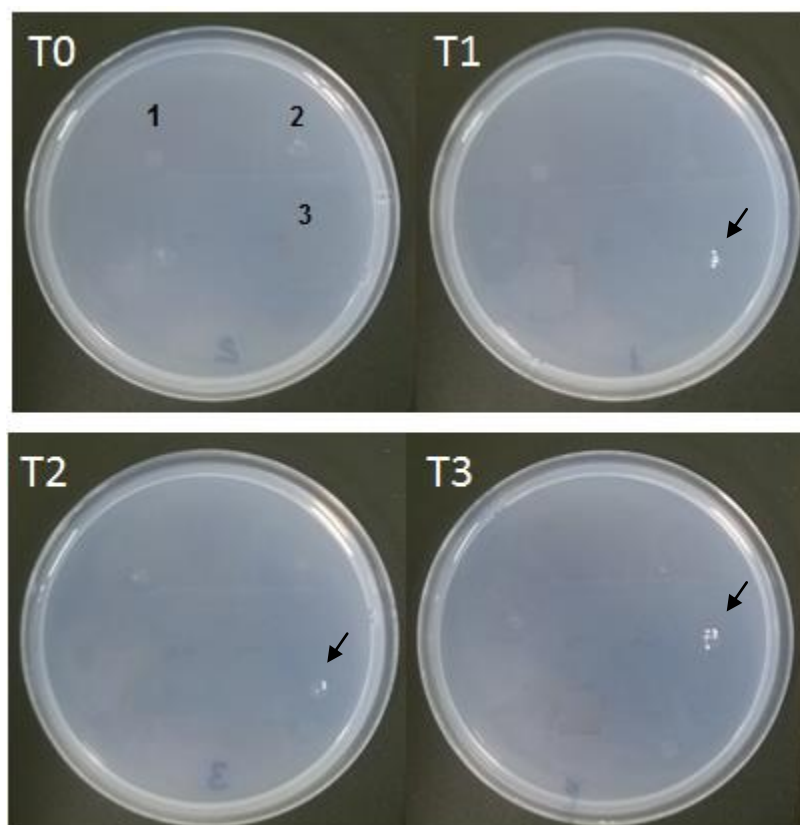


Figura 6. Tratamento da linhagem MM10-2a de levedura com a droga PT-31. Meio YNB com a linhagem de levedura MM10-2a e os tratamentos: 1, CN água ultradestilada; 2, CP MMS e 3, PT-31. Diferentes tempos: T0, 0 hora; T1, 1 hora; T2, 3 horas e T3, 24 horas. As setas indicam os tratamentos de PT-31, os únicos que formaram colônias (Fonte: do autor, 2014).

5.3 Curva de sobrevivência do Elixir Sanativo® (SAN)

A análise do Elixir Sanativo® constitui o teste experimental do segundo composto do presente estudo. Nesta parte, diferentes concentrações de Sanativo® (SAN, fórmula comercial) foram submetidas à montagem de uma curva de sobrevivência com larvas de *Drosophila melanogaster* do SMART.

Tabela 3. Sobrevivência média de larvas de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB.

Componentes	Cruzamento	Concentração (mL/ mL)	Médias de sobreviventes	Estatística
Água ultra destilada	ST		46,00	a
Sanativo®		1	1,00	c
		0,5	31,50	b
		0,25	47,00	a
		0,125	47,50	a
		0,0625	45,50	a
		0,0313	49,00	a
		0,0156	45,00	a
Doxorrubicina		0,125 mg/mL	47,00	a
ETA 1			0,00	c
ETA 2			0,00	c
Água ultra destilada	HB		46,00	a
Sanativo®		1	0,00	c
		0,5	30,50	b
		0,25	41,00	ab
		0,125	47,50	a
		0,0313	42,50	ab
Doxorrubicina		0,125 mg/ml	46,00	a
ETA 1			0,00	c
ETA 2			0,00	c

Estatística da sobrevivência larvar. Médias com a mesma letra não diferem entre si. Pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. ETA 1, etanol 50° e ETA 2, etanol 25°. ST com dms=9,83, MG=32,68, CV%=7,58 e Ponto médio=25,00; HB com dms=13,94, MG=28,17, CV%=12,50 e Ponto médio=25,00. Programa ASSISTAT (Silva, 2013).

Observando a tabela 3, as concentrações ETA 1 e ETA 2 em ambos os cruzamentos apresentaram ausência de indivíduos sobreviventes (nenhuma larva ST e HB sobreviveu até formar pupa), essas possuem concentração alcóolica equivalente a SAN 1 e SAN 0,5, respectivamente (elixir Sanativo® possui rótulo com indicação que é solução de álcool 96°, aproximando-se, desta forma, da concentração de álcool absoluto usada no experimento), desta maneira, SAN 1 possui mortalidade significativa equivalente a ETA 1, SAN 0,25 apresentou mortalidade significativamente reduzida. As demais concentrações não

apresentaram diferenças estatísticas entre si e em relação ao controle, em ambos os cruzamentos.

5.4 SMART do Elixir Sanativo® (SAN)

A continuidade experimental da curva de sobrevivência larval de SAN é o teste SMART. As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores do teste SMART após o tratamento crônico das larvas dos cruzamentos ST e HB, respectivamente, com as diluições seriadas de SAN, controle negativo (CN – água ultradestilada) e controle positivo (CP– DXR).

A Tabela 4 apresenta a frequência de manchas mutantes obtidas da progênie do cruzamento ST, indivíduos heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). De acordo com o número de manchas observadas, nota-se que o controle positivo (DXR) teve resultado estatístico positivo para MSP, MSG e TM, e o controle negativo (CN) apresentou os mais baixos números de manchas entre os tratamentos. Assim também, houve um aumento significativo da frequência de manchas mutantes nos grupos tratados de SAN, com aumento significativo na quantidade de manchas simples pequenas e manchas totais (MSP e MT), os grupos tratados comparados ao controle negativo. Esse aumento significativo de manchas (MSP e MT) é observado em quase todas as concentrações de SAN do cruzamentos ST.

O cálculo da recombinação da DXR foi 36,51%, além do TM, este controle apresentou também resultado significativo para MSP. Os tratamentos de ST que apresentaram recombinação relevante foram SAN 0,25 e SAN 0,0078, com 21,76 e 15,33%, respectivamente; além dos valores de TM, ambos apresentaram também MSP significativos. De todas as concentrações dos indivíduos *mwh/TM3*, SAN 0,125 foi a que mostrou resultado estatístico inconclusivo.

No cruzamento HB, revelado na tabela 5, mostra que o CP possui resultado estatístico significativo para MSP, MSG e TM, e o controle negativo (CN) teve os mais baixos números de manchas. As concentrações de SAN com aumento significativo na frequência de manchas foram: SAN 0,5 com aumento em TM e MSP e SAN 0,25, TM e MSG; SAN 0,125 e 0,0313 apresentaram resultados negativos

para MSP. Não houve porcentagem de recombinação calculável para os tratamentos e controles.

Tabela 4. Frequência de manchas mutantes obtidas por SMART da progênie do Cruzamento de Padrão (ST) dos indivíduos Heterozigotos Marcados (MH - *mwh/flr³*) e indivíduos Heterozigotos Balanceados (*mwh/TM3*). Tratamento crônico das larvas com as concentrações de Sanativo® (SAN 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0313 e 0,0156 mL/ mL), controle negativo e controle positivo de Doxorrubicina (DXR 0,125mg/mL).

Concentração (mL/ mL)	N. de Indiv. ^a (N)	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) estatística ^b								Recombinação (%)			
		MSP		MSG		MG		TM					
		(1-2 céls) ^c		(>2 céls) ^c									
		<i>m</i> = 2 ^e		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2					
<i>mwh/flr³</i>													
Água ultradestilada (CN)	29	0,66	(19)		0,03	(01)		0,00	(00)	0,69	(20)		
SAN 0,0156	38	1,16	(44)	+	0,16	(06)	i	0,05	(02)	i	1,37	(52)	+
SAN 0,0313	40	1,08	(43)	+	0,13	(05)	i	0,00	(00)	i	1,20	(48)	+
SAN 0,0625	40	0,88	(35)	i	0,03	(01)	i	0,03	(01)	i	0,93	(37)	i
SAN 0,125	22	1,36	(30)	+	0,05	(01)	i	0,00	(00)	i	1,41	(31)	+
SAN 0,25	30	1,73	(52)	+	0,13	(04)	i	0,00	(00)	i	1,87	(56)	+
SAN 0,5	10	1,60	(16)	+	0,10	(01)	i	0,00	(00)	i	1,70	(17)	+
Doxorrubicina (CP)	38	1,50	(57)	+	0,26	(10)	+	0,13	(05)	i	1,89	(72)	+
<i>mwh/TM3</i>													
Água ultradestilada (CN)	19	0,47	(09)		0,00	(00)		f		0,47	(09)		g
SAN 0,0156	19	1,16	(22)	+	0,00	(00)	i			1,16	(22)	+	15,33
SAN 0,0313	20	1,10	(22)	+	0,05	(01)	i			1,15	(23)	+	4,17
SAN 0,125	20	1,30	(26)	+	0,00	(00)	i			1,30	(26)	+	7,80
SAN 0,25	19	0,89	(17)	i	0,05	(01)	i			0,95	(18)	i	
SAN 0,5	18	1,22	(22)	+	0,11	(02)	i			1,33	(24)	+	21,76
Doxorrubicina (CP)	20	1,20	(24)	+	0,00	(00)	i			1,20	(24)	+	36,51

Tabela 5. Frequência de manchas mutantes obtidas por SMART da progênie do Cruzamento de Alta Bioativação (HB), indivíduos Heterozigotos Marcados (MH - *mwh/flr³*) e indivíduos Heterozigotos Balanceados (*mwh/TM3*). Tratamento crônico das larvas com as concentrações de Sanativo® (SAN 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0313 mL/ mL), controle negativo e controle positivo de Doxorrubicina (DXR 0,125 mg/mL).

Concentração (mL/ mL)	N. de Indiv. ^a (N)	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) estatística ^b								Recombinação (%)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^c <i>m</i> = 2 ^e		(>2 céls) ^c <i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2		
<i>mwh/flr</i> ³										
Água ultradestilada (CN)	35	0,86	(30)	0,06	(02)	0,00	(00)	0,91	(32)	
SAN 0,0313	36	1,11	(40) -	0,14	(05) i	0,00	(00) i	1,25	(45)	i
SAN 0,125	34	1,03	(35) -	0,18	(06) i	0,00	(00) i	1,21	(41)	i
SAN 0,25	24	1,29	(31) i	0,29	(07) +	0,00	(00) i	1,58	(38)	+
SAN 0,5	35	1,83	(64) +	0,06	(02) i	0,03	(01) i	1,91	(67)	+
Doxorrubicina (CP)	40	2,45	(98) +	0,45	(18) +	0,08	(03) i	2,98	(119)	+
<i>mwh/TM3</i>										
Água ultradestilada (CN)	20	1,10	(22)	0,05	(01)	f		1,15	(23)	g
SAN 0,25	13	0,69	(09) -	0,00	(00) i			0,69	(09)	-
SAN 0,5	8	0,25	(02) -	0,38	(03) i			0,63	(05)	-
Doxorrubicina (CP)	20	0,30	(06) -	0,10	(02) i			0,40	(08)	-

^aNúmero máximo de indivíduos obtidos para a realização do experimento. ^bEstatística segundo Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^cInclusão de manchas simples *flr³* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas (MG). ^eFator de multiplicação. ^fManchas gêmeas inexistentes no indivíduos *mwh/TM3*. ^gPorcentagem de recombinação – sem resultados para estes grupos. MSP – mancha simples pequena (*mwh* ou *flr³* isolada uma da outra); MSG – mancha simples grande (*mwh* ou *flr³* isolada uma da outra); TM – total de manchas. Em indivíduos *mwh/TM3* apenas manchas simples *mwh*, visto que o cromossomo balanceador *TM3* não possui o gene mutante *flr³*.

5.5 SMART do extrato do Elixir Sanativo® (E. SAN)

Após os experimentos com elixir Sanativo®, foi realizado o SMART do extrato de Sanativo® (E. SAN), visando avaliar também a influência do etanol nos seus constituintes químicos bem como na mutagênese observada. Os dados do SMART de E. SAN são abordados nas Tabelas 6 e 7, cruzamentos ST e HB, respectivamente.

Tabela 6. Frequência de manchas mutantes obtidas por SMART da progênie do Cruzamento Padrão (ST), indivíduos Heterozigotos Marcados (MH - *mwh/flr³*) e indivíduos Heterozigotos Balanceados (*mwh/TM3*). Tratamento crônico das larvas com as concentrações de extrato de Sanativo® (28,92; 14,46; 7,23; 3,615; 1,81; 0,904 e 0,452 mg/ mL), controle negativo e controle positivo de Doxorrubicina (DXR 0,125 mg/mL).

Concentração (mg/ mL)	N. de indiv. ^a (N)	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) estatística ^b								Recombinação (%)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^c <i>m</i> = 2 ^e		(>2 céls) ^c <i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2		
<i>mwh/flr</i> ³										
Água ultradestilada	26	0,15	(04)	0,12	(03)	0,00	(00)	0,27	(07)	
E. SAN 0,452	18	0,22	(04) i	0,06	(01) i	0,06	(01) i	0,33	(06)	i
E. SAN 0,904	15	0,13	(02) i	0,13	(02) i	0,07	(01) i	0,33	(05)	i
E. SAN 1,81	11	0,27	(03) i	0,09	(01) i	0,09	(01) i	0,45	(05)	i
E. SAN 3,615	10	0,90	(09) +	0,00	(00) i	0,00	(00) i	0,90	(09)	+
E. SAN 7,23	29	0,59	(17) +	0,07	(02) i	0,00	(00) i	0,66	(19)	+
E. SAN 14,46	17	0,47	(08) i	0,12	(02) i	0,00	(00) i	0,59	(10)	i
E. SAN 28,92	18	0,78	(14) +	0,11	(02) i	0,00	(00) i	0,89	(16)	+
DXR 1,25	39	1,36	(53) +	0,08	(03) i	0,05	(02) i	1,49	(58)	+
<i>mwh/TM3</i> ^f										
Água ultradestilada	14	0,71	(10)	0,00	(00)	g		0,71	(10)	h
E. SAN 7,23	15	0,67	(10) i	0,00	(00) i			0,67	(10)	i
E. SAN 28,92	9	0,78	(07) i	0,00	(00) i			0,78	(07)	i
DXR 1,25	16	0,88	(14) i	0,00	(00) i			0,88	(14)	i

^aNúmero máximo de indivíduos obtidos para a realização do experimento. ^bEstatística segundo Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^cInclusão de manchas simples *flr³* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas (MG). ^eFator de multiplicação. ^fNão houveram adultos suficientes para montagem de lâminas da concentração E. SAN 3,615. ^gManchas gêmeas inexistentes no indivíduos *mwh/TM3*. ^hNão foi possível obter a porcentagem de recombinação. MSP – mancha simples pequena (*mwh* ou *flr³* isolada uma da outra); MSG – mancha simples grande (*mwh* ou *flr³* isolada uma da outra); TM – total de manchas. Em indivíduos *mwh/TM3* apenas manchas simples *mwh*, visto que o cromossomo balanceador *TM3* não possui o gene mutante *flr³*.

Tabela 7. Frequência de manchas mutantes obtidas por SMART da progênie do Cruzamento de Alta Bioativação (HB), indivíduos Heterozigotos Marcados (MH - *mwh/flr³*) e indivíduos Heterozigotos Balanceados (*mwh/TM3*). Tratamento crônico das larvas com as concentrações de extrato de Sanativo® (28,92; 14,46; 7,23; 3,615; 1,81; 0,904 e 0,452 mg/ mL), controle negativo e controle positivo de Doxorrubicina (DXR 0,125 mg/mL).

Concentração (mg/ mL)	N. de indiv. ^a (N)	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) estatística ^b								Recombinação (%)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^c		(>2 céls) ^c						
		<i>m</i> = 2 ^e		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2		
<i>mwh/flr</i> ³										
Água ultradestilada	17	0,12	(02)	0,00	(00)	0,06	(01)	0,18	(03)	
E. SAN 0,452	41	0,34	(14) i	0,07	(03) i	0,02	(01) i	0,44	(18)	i
E. SAN 0,904	20	0,45	(09) i	0,10	(02) i	0,00	(00) i	0,55	(11)	i
E. SAN 1,81	41	0,22	(09) i	0,07	(03) i	0,02	(01) i	0,32	(13)	i
E. SAN 3,615	33	0,70	(23) +	0,03	(01) i	0,06	(02) i	0,79	(26)	+
E. SAN 7,23	23	0,48	(11) +	0,00	(00) i	0,00	(00) i	0,48	(11)	i
E. SAN 14,46	24	0,33	(08) i	0,13	(03) i	0,00	(00) i	0,46	(11)	i
E. SAN 28,92	13	0,46	(06) i	0,00	(00) i	0,08	(01) i	0,54	(07)	i
DXR 1,25	26	1,15	(30) +	0,08	(02) i	0,15	(04) i	1,38	(36)	+
<i>mwh/TM3</i> ^f										
Água ultradestilada	16	0,81	(13)	0,00	(00)	g		0,81	(13)	h
DXR 1,25	21	0,90	(19) i	0,10	(02) i			0,90	(19)	i

^aNúmero máximo de indivíduos obtidos para a realização do experimento. ^bEstatística segundo Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^cInclusão de manchas simples *flr³* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas (MG). ^eFator de multiplicação. ^fNão houveram adultos suficientes para montagem de lâminas da concentração E. SAN 3,615. ^gManchas gêmeas inexistentes no indivíduos *mwh/TM3* ^hNão foi possível obter a porcentagem de recombinação. MSP – mancha simples pequena (*mwh* ou *flr³* isolada uma da outra); MSG – mancha simples grande (*mwh* ou *flr³* isolada uma da outra); TM – total de manchas. Em indivíduos *mwh/TM3* apenas manchas simples *mwh*, visto que o cromossomo balanceador *TM3* não possui o gene mutante *flr³*.

A Tabela 6 é a do cruzamento ST e sua progênie, com os indivíduos heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Os dados apresentados mostram que o controle positivo (DXR) teve frequência de TM e MSP significativas, enquanto que o controle negativo revelou os menores números de manchas mutantes. Nos grupos tratados, houve aumento significativo da frequência de manchas mutantes MSP e MT nas concentrações 28,92; 7,23 e 3,615 de E. SAN. As mesmas concentrações e os controles revelaram resultados estatísticos inconclusivos para manchas, quando os indivíduos *mwh/TM3* foram analisados, desta forma também não é possível identificar o potencial recombinogênico dos grupos.

Na Tabela 7, que apresenta o cruzamento HB, nota-se que DXR também revelou frequência de TM e MSP significativas e o CN teve os menores números de manchas mutantes. Os tratamentos com frequências de manchas significativas foram as concentrações 7,23 (MSP) e 3,615 (TM e MSP), que diferiu dos resultados apresentados na tabela ST. Os indivíduos *mwh/TM3* dos controles foram analisados, e os resultados da DXR foram inconclusivos, sendo também impossível identificar o potencial de recombinação.

5.6 Análise do extrato de Elixir Sanativo® (E. SAN) em leveduras

O teste em *Saccharomyces cerevisiae* procedeu ao teste SMART na análise de danos genéticos do E. SAN. A Figura 7 revela a montagem com fotos das culturas das sete linhagens de leveduras (BY4741, BY4742, *Δrad1*, *Δrad10*, *Δrev1*, *Δrev7* e *Δrad52*) em YPD, apresentando a viabilidade das colônias frente à concentração de 28,92 mg/mL de E. SAN. Enquanto que a figura 8 se trata das placas de YNB (suplementado com aminoácidos, exceto lisina) onde se foram cultivadas a linhagem MM10-2a também com os controles e tratamento (E. SAN), sem formação de nenhuma colônia.

Na Figura 7, é possível observar que os controles apresentados são os mesmos do tratamento com PT-31 (Figura 5), separados neste trabalho apenas de forma didática. Para o tratamento com a solução de E. SAN, é notável também a semelhança entre o crescimento das colônias de E. SAN com CN, expondo, da

mesma forma, na linhagem $\Delta rev7$ menores tamanhos. Na Figura 8 também houve ausência de formação de colônias de MM10-2a no tratamento e nos controles.

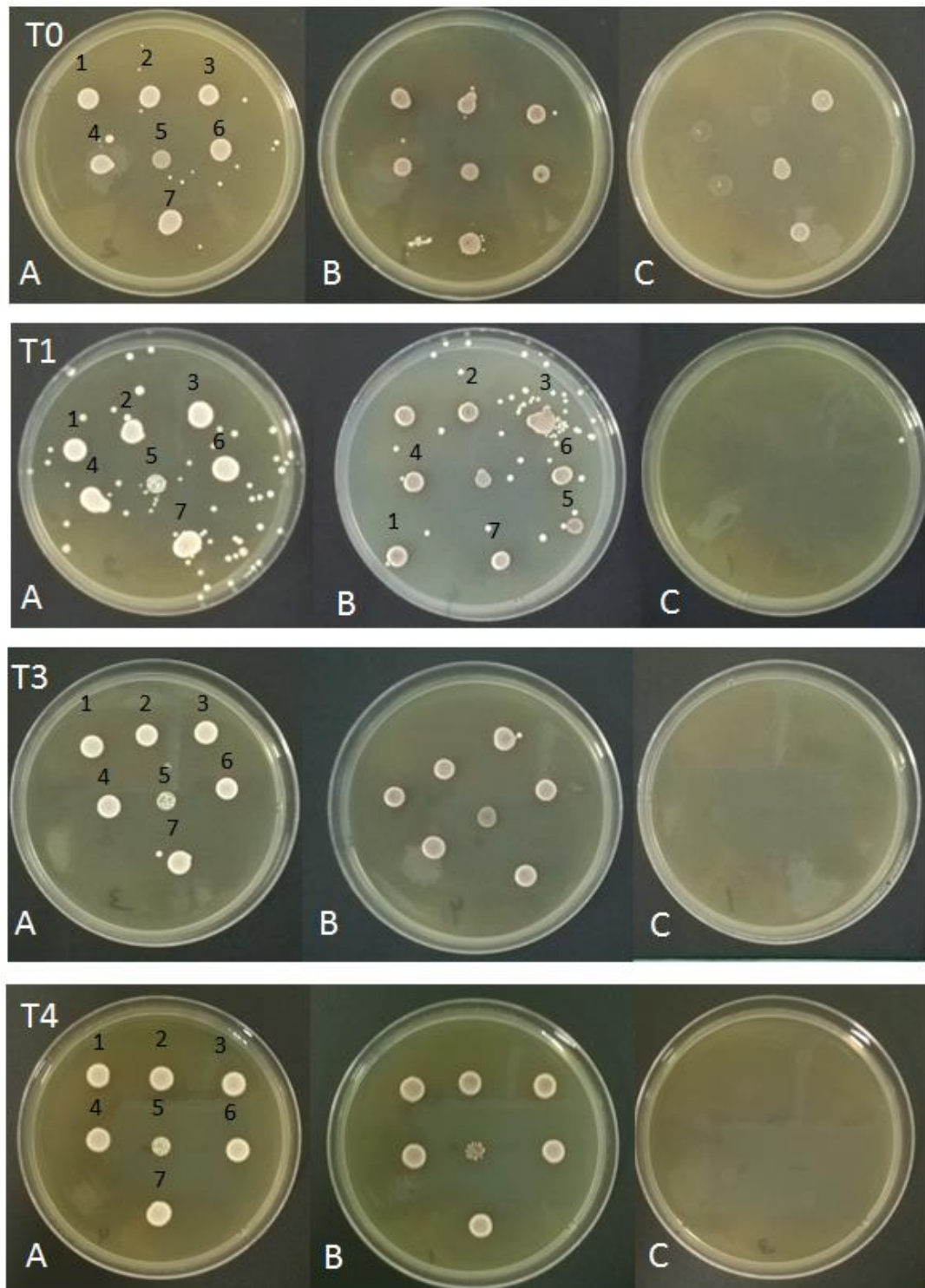


Figura 7. Tratamento de leveduras com a solução de E. SAN. Meio YPD com as linhagens de levedura, respectivamente, 1, BY4742; 2, $\Delta rad1$; 3, $\Delta rad10$; 4, $\Delta rad52$; 5, $\Delta rev7$; 6, $\Delta rev1$ e 7, BY4741, nos diferentes tempos: T0, 0 hora; T1, 1 hora; T2, 3 horas e T3, 24 horas. Os tratamentos foram A, água ultradestilada (controle negativo - CN); B, solução de E. SAN e C, MMS (controle positivo - CP) (Fonte: do autor, 2014).

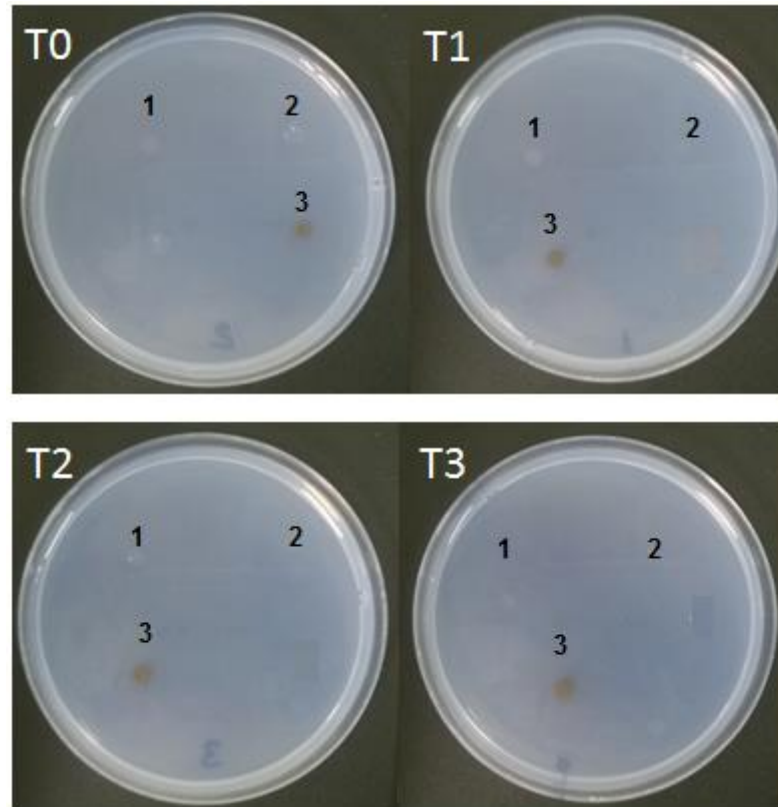


Figura 8. Tratamento da linhagem MM10–2a de levedura com a solução de E. SAN. Meio YNB com a linhagem de levedura MM10–2a e os tratamentos: 1, CN - água ultradestilada; 2, CP - MMS e 3, PT-31 nos diferentes tempos: T0, 0 hora; T1, 1 hora; T2, 3 horas e T3, 24 horas (Fonte: do autor, 2014).

6 Discussão

6.1 SMART de PT-31

No teste SMART de PT-31, foi possível observar na Tabela 1 o cruzamento ST, a frequência estatística positiva para TM indica que as concentrações 7,5 e 3,75 e 1,875 mg/mL de PT-31 apresentam efeito mutagênico, com possibilidade de efeito dose-dependente, enquanto MSP pode indicar que as concentrações 7,5 e 3,75 mg/mL podem ter produzido mutações em eventos mais recente da divisão celular (Guzmán-Ricón e Graf, 1995). Embora PT-31 3,75 mg/mL tenha apresentado resultado negativo em indivíduos *mwh/TM3*, não é possível concluir que dos efeitos mutagênicos observados nas concentrações podem também ter sido intensificados por atividade recombinogênica, pois as outras duas concentrações analisadas se mostraram estatisticamente inconclusivas. Esses resultados foram independentes do metabolismo enzimático do sistema P450.

Com a observação da tabela 2, cruzamento HB, foi possível analisar também a capacidade metabólica que o fármaco sofreu. Todas as três concentrações que revelaram atividade mutagênica em ST, 7,5 e 3,75 e 1,875 mg/mL, apresentaram maior frequência de TM em HB que em ST, ainda que PT-31 3,75 se mostrou inconclusivo, neste caso indicando ativação do fármaco pelo metabolismo do sistema P450, inclusive com atividade recombinogênica. Desta forma, observa-se que o produto do metabolismo de PT-31 no sistema enzimático potencializa a atividade mutagênica e recombinogênica do composto.

PT-31 é um analgésico sintetizado recentemente com atividade terapêutica em animais e *in vitro*, em que há um estudo anterior que avaliou a atividade mutagênica, genotóxica, citotóxica e tóxica, por meio dos testes de *Allium cepa*, ensaio cometa e micronúcleo, sem identificar o mecanismo que induz danos, sugerindo estudos posteriores (Lucio Neto, 2011). Nesse estudo, relata-se que altas concentrações da droga (5.0 mg/mL no teste de *Allium cepa* e 5.0 mg/kg em micronúcleo e ensaio cometa) apresentou efeito citotóxico, mutagênico e genotóxico, que corrobora alguns dos resultados do teste SMART, apresentados no presente estudo.

Relata-se que PT-31 tem alta afinidade nos sítios ativos de α_2 -adrenoceptor para induzir efeito antinociceptivo. A união é realizada entre PT-31 e o resíduo ILE-

190 por ponte de hidrogênio, possivelmente explicado *in silico* (Sudo et al., 2010). Não é conhecido o mecanismo que PT-31 pode produzir o efeito mutagênico (Lucio Neto, 2011), mas como componente imidazole, talvez PT-31 possa causar danos no genoma (Lucio Neto, 2011), diretamente, ou pode produzir inibição de interação proteína-proteína (Wolkenberg et al., 2004) na função do DNA. Adicionalmente, foi observado no presente estudo a atividade de bioativação do fármaco pelo citocromo P450, visto que os tratamentos de PT-31 aumentaram suas atividades mutagênicas no cruzamento de alta bioativação (HB).

Assim, foi apresentado aqui que PT-31 possui efeito mutagênico e atividade recombinogênica em que as concentrações podem se comportar com efeito dose-dependente, como também existe aparente aumento da atividade metabólica do composto. Essas peculiaridades podem ser inerentes a propriedades químicas particulares da droga, no entanto, mais informações são necessárias para complementar estes estudos.

6.2 PT-31 em leveduras

As figuras das placas de *S. cerevisiae* tratadas com PT-31 e os controles (CP e CN), apresentaram que o fármaco na concentração 7,5 mg/mL não influenciou a sobrevivência de nenhuma das linhagens das leveduras, de forma que os possíveis efeitos mutagênicos ou recombinogênicos não foram expressos fenotipicamente. Desta forma, pode ser que a concentração investigada tenha induzido mutações, mas que não foi possível de serem observadas, por não afetarem efetivamente a sobrevivência das linhagens, ou não afetaram especificamente nem os genes que conferiam suscetibilidade as linhagens nem as rotas metabólicas as quais os genes estão relacionados. Por outro lado, PT-31 induziu mutação de ponto na linhagem MM10-2a, uma mutação de efeito direto no gene do metabolismo da lisina ou influir no mecanismo de produção desta, que pôde favorecer a sobrevivência dessa linhagem.

Na literatura há relatos que componentes que constituem o fármaco PT-31 (como anéis heterocíclicos e compostos imidazoles) foram avaliados em *Saccharomyces cerevisiae*. Dentre esses compostos presentes em PT-31 estão as aminas aromáticas heterocíclicas, que são classes de potentes mutágenos em

bactérias e carcinógenos de roedores, induziram mutação e recombinação mitótica em linhagens de *S. cerevisiae*, são compostos com atividade de conversão metabólica, em que os produtos do metabolismo do citocromo P450 podem causar danos ao DNA (Paladino et al., 1999).

Especificamente, existem informações sobre genotoxicidade de compostos imidazoles em *S. cerevisiae* como o estudo sobre aflatoxina B₁. Compostos imidazoles estão presentes na estrutura desta aflatoxina, que é uma micotoxina com potencial carcinógeno responsável por neoplasias em diversas espécies animais. Os autores citam que a aflatoxina B₁ é um mutágeno fraco, mas em *S. cerevisiae*, a micotoxina induziu recombinação heteroalélica e translocações cromossômicas (Keller-Seitz et al., 2004).

Esses pesquisadores discutem que o efeito recombinogênico se deve a fatores como a ligação da aflatoxina ao DNA, formando aductos que se convertem a quebra dupla-fita de DNA, seu anel imidazol positivamente carregado está inserido no processo (Keller-Seitz et al., 2004). Mas, modificações na estrutura do anel imidazolidínico (compostos heterocíclicos modificados do anel imidazol) podem alterar suas propriedades físico-químicas e efeitos biológicos (Pitta et al., 2006).

Como o anel imidazol presente no fármaco PT-31 é diferente de outros compostos imidazoles, cujos efeitos no DNA foram investigados, os efeitos do fármaco também podem ser diferentes. No presente estudo, não houve alteração no crescimento das linhagens (BY4741, BY4742, $\Delta rad1$, $\Delta rad10$, $\Delta rev1$, $\Delta rev7$ e $\Delta rad52$), mas a linhagem MM10-2a apresentou crescimento de colônias nos intervalos T1 a T3. Neste último caso, um mecanismo que pode explicar o fato é uma mutação de ponto na linhagem, produzida por PT-31, que favoreceu o desenvolvimento das colônias. Embora seja uma hipótese, esse mecanismo deve ser analisado, tendo em vista ampliar as informações de mutagênese que o composto produz, que ainda são pouco conhecidas na literatura. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os experimentos de danos no DNA dos estudos de Lucio Neto (2011).

6.3 Curva de sobrevivência larvar do elixir Sanativo® (SAN)

Nos resultados da curva de sobrevivência larvar, SAN 0,5 e SAN 0,25 tiveram redução de sobrevivência significativa. Possivelmente, a mortalidade total tenha sido produzida pela concentração de álcool presente, muito acima dos 10% que, normalmente, as moscas podem encontrar em alimentos na natureza. Concentrações de álcool superiores a 10% podem reduzir a taxa de sobrevivência de adultos (Scholz et al., 2000 e Ribeiro e Galvão, 2010), além de apresentar efeito genotóxico comprovado (Ribeiro e Galvão, 2010). O tempo em que as larvas ficaram expostas ao álcool também pode ter interferido na sobrevivência (Scholz et al., 2000), devido ao tratamento crônico de aproximadamente 48 horas (Danesi et al., 2012 e Graf et al., 1998).

Como os tratamentos SAN 0,25 dos cruzamentos ST e HB apresentaram larvas mais tolerantes que as dos grupos ETA 25º equivalentes, e, ainda assim, a pequena resistência observada em SAN 0,5 do cruzamento ST (que equivaleria a ETA 50º), supõe-se que de alguma maneira os compostos contidos na solução SAN aumentaram a resistência das larvas ao álcool. Assim também, em experimento realizado por Asano e Wanderley (2007), SAN inibiu os efeitos de lesões gástricas de ratos Wistar induzidas por etanol (Ansano e Wanderley, 2007), que ajuda a entender um pouco melhor que pode haver realmente uma interação entre substâncias na redução do efeito tóxico do álcool.

Ribeiro e Galvão (2010) testaram o efeito tóxico do álcool em *D. melanogaster* e revelaram que, embora não apresentassem toxicidade, as maiores faixas das concentrações testadas apresentaram genotoxicidade. Outros compostos de composição alcóolica também já foram testados, como, por exemplo, o experimento de Rodrigues et al. (2007) sobre avaliação de genotoxicidade de enxaguantes bucais com SMART, indicou efeito genotóxico, provavelmente devido a composição alcóolica. No atual estudo, a combinação dos vários componentes do elixir Sanativo® pode ter sido a responsável por apresentar efeito protetor contra o etanol, observado na curva de sobrevivência. Partindo da observação dos experimentos SMART avaliando a atividade mutagênica do etanol (Orsolin et al., 2012) é possível também visualizar uma tendência de concentração do álcool na mutagênese, bem como os experimentos do SMART deste trabalho.

6.4 SMART do elixir Sanativo® (SAN)

O ensaio SMART de SAN revelou que estatisticamente as concentrações do cruzamento ST foram mutagênicas, considerando o resultado inconclusivo de SAN 0,0625 uma flutuação de valor dentre a frequência de manchas das concentrações, poder-se-ia sugerir um efeito dose-dependente produzido pelas concentrações. Destas, a porcentagem de recombinação mais relevante foi apresentada em SAN 0,5, indicando que as concentrações foram mais mutagênicas que recombinogênicas.

Diferentemente destes resultados do Cruzamento Padrão (ST), no cruzamento de Alta Bioativação (HB), apenas as concentrações 0,5 e 0,25 mg/mL revelaram efeito mutagênico, essas sem potencial de recombinogênese. Que sugere que não houve ativação de constituintes do SAN, mas que, ao contrário, houve metabolismo e redução do efeito mutagênico das concentrações de SAN pelo sistema P450.

Os efeitos mutagênicos como os revelados na grande maioria das concentrações do experimento SMART de SAN, devem ser atribuídos à composição do elixir, que além de ser uma solução hidroalcóolica, é formada por muitos constituintes químicos, que podem atuar de maneira isolada ou sinérgica. Por exemplo, o elixir é formado por um conjunto de extrato de plantas. Uma das plantas é o angico (*Anadenanthera colubrina* Vell. Brenan) (Pessoa et al., 2012), experimentos de efeito bactericida com este extrato de planta foram comprovados, utilizando seu extrato hidroalcolico (Weber Sobrinho, 2010) e extrato etanólico (Araújo, 2013). No mesmo trabalho, Araújo (2013) investigou também que nas concentrações empregadas do extrato não apresentaram atividade mutagênica em eritrócitos de roedores. O angico é rico em taninos e proantocianidinas com diversas atividades terapêuticas (Pessoa et al., 2012).

Foi relatado que SAN tem uma menor concentração de flavonoides, esteroides e açúcares (Asano e Wanderley, 2007). Entre os compostos contidos em SAN, estão os taninos, tidos como moduladores de mutagênese de outras substâncias, suprimem aberrações cromossômicas produzidas por agentes mutagênicos e limpam radicais livres em componentes mais estáveis. Em *D. melanogaster*, taninos apresentaram efeito modulador contra danos induzidos no

DNA. Os polifenóis (flavonoides) também apresentam atividade de absorção de radicais livres. Há relatos também de atividade antitumoral de triterpenoides (Mendanha et al., 2010).

Além do que já foi descrito, foi revelado que o extrato da casca do caule de *Schinus terebinthifolius* (aroeira) não causa quebra direta da molécula de DNA em plasmídeos, mas produz danos no DNA e mutação em bactéria (Carvalho et al., 2003). Enquanto *Physalis angulata* (camapu), apesar do seu uso medicinal asma, problemas urinários, reumatismo e tumores (Rengifo e Vargas, 2013), o extrato da planta foi descrito como indutor de efeitos genotóxicos em linfócitos humanos *in vitro* (Santos et al., 2008).

Desconhece-se, no entanto, testes SMART e testes em *Saccharomyces cerevisiae* realizados com extratos destas plantas, como obviamente também testes com Sanativo®. Assim, este trabalho mostrou, que houve atividade mutagênica (Indivíduos ST) com bioativação metabólica ausente (Indivíduos HB), bem como ação recombinogênica relacionada com a concentração, que parece neste caso depender da ativação metabólica. Indicando, como apresentado, influencia da combinação dos vários compostos do elixir no processo de mutagênese, que pode ser verificada em futuros experimentos.

6.5 SMART do extrato do elixir Sanativo® (E. SAN) e comparação com SMART do elixir Sanativo®

Como já bordado, o fitoterápico Sanativo® é uma solução alcóolica, e foi observado que a influência do etanol afeta a sobrevivência larvar (Tabela 3), como também referências na literatura apontam sua participação na mutagênese. Desta forma, foi realizado o estudo do SMART do extrato de SAN, ou seja, SAN sem etanol.

As concentrações 28,92; 7,23 e 3,615 mg/mL apresentaram atividade mutagênica em indivíduos ST, mas a percentagem de recombinogênese não foi identificada. Enquanto que, os dados inconclusivos, obtidos na maioria dos indivíduos HB, não permitiram inferir se as concentrações podem também sofrer interferência metabólica do sistema P450.

Comparando os resultados obtidos no experimento de SAN e E. SAN. Em relação ao cruzamento ST, observa-se também em E. SAN aumento significativo no número de manchas nas maiores concentrações, entretanto os valores proporcionais de mancha por indivíduo de todas as concentrações deste tratamento são menores que os mesmos valores de SAN. Pode-se indicar efeito dose-dependente, considerando o resultado de E. SAN 14,46 como flutuação dentro das concentrações. Também se pode dizer que os valores proporcionais de mancha por indivíduo de todas as concentrações do cruzamento HB do experimento de E. SAN são menores que os de SAN, embora E. SAN mostrou resultados inconclusivos em HB, possivelmente devido também a flutuações entre as concentrações.

Neste trabalho, há indicação de que determinadas concentrações dos tratamentos SAN e E. SAN produzem efeitos mutagênicos no teste SMART, de acordo com os resultados das tabelas do SMART. Mas, dentre os dois tratamentos, o SMART de E. SAN apresentou menos concentrações com manchas mutantes estatisticamente significativas. A diferença observada entre os experimentos de SAN e E. SAN pode ser parcialmente atribuída à presença de etanol na composição do Elixir Sanativo® (SAN), como é amplamente conhecido o efeito mutagênico do etanol em vários estudos (Rodrigues *et al.*, 2007; Ribeiro e Galvão, 2010; Orsolin *et al.*, 2012). O efeito mutagênico observado na composição do Elixir sem etanol (E. SAN) indica também possível ação mutagênica de um dos vários constituintes do fitoterápico, ou a combinação dos vários compostos existentes.

6.6 Extrato do elixir Sanativo® (E. SAN) em leveduras

A concentração de E. SAN testada não produziu efeito mutagênico observável fenotipicamente nos testes em leveduras. Deduzindo-se que a solução tem baixa ou nenhuma influencia metabólica, nenhum efeito mutagênico ou recombinogênico, que interfira na sobrevivência das linhagens de recombinação e reversão. Esse resultado foi negativo, diferentemente do resultado de mutagênese observado no teste SMART do extrato, descrito acima.

Essas diferenças podem ser devido ao Elixir possui 20% do extrato de angico em sua composição – pela inexistência de atividade mutagênica em eritrócitos de roedores (Araújo, 2013), produzindo em leveduras, como organismo modelo de

reparo de danos no DNA (Matuo et al., 2010) o efeito neutro. Bem como, é possível também que a concentração testada tenham produzido mutações que não afetaram o desenvolvimento ou sobrevivência das linhagens, por não afetarem os genes que conferem suscetibilidade, nem as rotas metabólicas que os genes controlam.

Há, então, a importância do presente estudo e sua continuidade em futuros trabalhos, empregando outros organismos para um completo entendimento do efeito dos compostos do Sanativo® isolados e associados; o estudo da interação dos constituintes de SAN e etanol em pré e pós-tratamentos na indução de mutação em *Drosophila* e outros organismos; bem como a análise de possíveis deferentes mutações que os compostos podem produzir.

7 Conclusões

- 1 O fármaco PT-31 nas concentrações testadas apresenta atividade mutagênica e recombinogênica com possível efeito dose-dependente, sendo metabolicamente ativado pelo sistema P450.
- 2 As soluções de Sanativo® testadas revelaram que SAN apresenta efeito protetor contra a toxicidade do etanol, mas possui atividade mutagênica, sugerindo efeito dose-dependente, e efeito mutagênico reduzido pelo metabolismo do sistema P450.
- 3 E. SAN se mostrou com atividade mutagênica nas maiores concentrações.
- 4 Comparando os resultados do SMART e os testes com leveduras da droga PT-31, percebe-se a existência de efeito mutagênico na maioria. Na comparação dos resultados do SMART e os testes com leveduras de E. SAN, infere-se que houve ação mutagênica, e o etanol na composição pode potencializar esta ação.

Referências

- Abdel-Wahab BF, Ghada EA and Badria FA (2011). Synthesis, antimicrobial, antioxidant, anti-hemolytic and cytotoxic evaluation of new imidazole-based heterocyclic. Elsevier Masson SAS.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) (2013). Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2ª v. Brasília: ANVISA, 14p.
- Alzieu T, Lehmann J, Naidu AB, Martin RE and Britton R (2014). Converting oxazoles into imidazoles: new opportunities for diversity-oriented synthesis. *Chem Comm*, 50:1867—1870.
- Araújo JSC (2013). Investigação dos efeitos citotóxico, genotóxico e o potencial antibacteriano associados ao biofilme dental dos taninos isolados de *Anacardium occidentale* Linn e *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. Dissertação de mestrado Campina Grande – PB.
- Arduengo AJ III, Dias RHV, Harlow RL and Kline M (1992). Eletronic stabilization of nucleophilic carbenes. *J Am Chem Soc*, 114: 5530– 5534.
- Arossi GA, Lehmann M, Dihl RR, Reguly ML and Andrade HHR (2010). Induced DNA Damage by Dental Resin Monomers in Somatic Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 106 (2):124–129.
- Asano LYJ and Wanderley AG (2007). Avaliação das atividades anti-úlceras do fitoterápico Sanativo®. XV CONIC XV Congresso de Iniciação Científica da UFPE 40317.
- Azoubel MCF and Ribeiro NCR (2013). O efeito local do uso do Schinus Terebinthifolius e Associações (Sanativo) no Pós Operatório de Exodontia de Molares inferiores. *Rev Bahiana Odonto*, 4:3-17.
- Bishop AJR and Schiestl RH (2002). Homologous recombination and its role in carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*, 2,.75-85.
- Campos SRSLC, Rieger TT and Santos JF (2007). Homology of polytene elements between *Drosophila* and *Zaprionus* determined by *in situ* hybridization in *Z. indianus*. *Genetics and Molecular Research*, 6 (2): 162 -176.

- Carvalho MCRD, Barca FNTV, Agnez-Lima LF and Medeiros SRB (2003). Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42(3):185–191.
- Costa WF and Nepomuceno JC (2006). Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 47, 18–24.
- Costa M (2008). Padrões de assimetria ao longo da distribuição geográfica de *Drosophila antonietae* TINDON-SKLORZ & SENE. Dissertação de mestrado – UFPR, Curitiba.
- Chi P, Kwon Y, Seong C, Epshtein A, Lam I, Sung P and Klein HL (2006). Yeast recombination factor Rdh54 functionally interacts with the Rad51 recombinase and catalyzes Rad51 removal from DNA. *J. Biol. Chem.*, 281(36):26268-79.
- Chlebowicz E and Jachymczyk WJ (1979). Repair of MMS-Indueed DNA Double-Strand Breaks in Haploid Cells of *Saccharomyces cerevisiae*, which Requires the Presence of a Duplicate Genome. *Genet.* 167: 279 286.
- Cunha KS, Reguly ML, Graf U and Andrade HH (2001). Taxanes: the genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 16(1):79-84.
- Danesi CC, Dihl RR, Bellagamba BC, de Andrade HH, Cunha KS, Guimarães NN and Lehmann M (2012). Genotoxicity testing of combined treatment with cisplatin, bleomycin, and 5-fluorouracil in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 747: 228–233.
- Docherty KM, Hebbeler SZ and Kulpa JRFC (2006). An assessment of ionic liquid mutagenicity using the Ames Test. *Green Chemistry*, 8: 560–567.
- Dong Z and Fasullo M (2003). Multiple recombination pathways for sister chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae*: role of *RAD1* and the *RAD52* epistasis group genes. *Nucleic Acids Res.* May 15, 31(10): 2576–2585.
- Felício LP, Silva EM, Ribeiro V, Miranda CT, Vieira ILBF, Passos DCS, Ferreira AKS, Vale CR, Lima DCS, Carvalho S and Nunes WB (2011). Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*: SMART/wing. *Genet Mol Res* 10 (1): 16-24.

- Fonseca CA and Pereira DG (2004). Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma*, 16 (7-8).
- Forster R, Blowers SD, Cinelli S, Marquardt H and Westendorf J (1992). Mutagenicity testing of imidazole and related compounds. *Mutat Res*, 298:71-79.
- Fragiorge EJ, Spanó MA and Antunes LMG, (2007). Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol* 30: 449–455.
- Fragiorge EJ, Rezende AAA, Graf U and Spanó MA (2008). Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol*, 46:393–401.
- Frei H and Würgler FE (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res*, 203:297–308.
- Friedman GD, Jiang SF, Udaltsova N, Quesenberry CP Jr, Chan J, Habel LA (2009). Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity. *Int J Cancer* 125(9):2173-8. doi: 10.1002/ijc.24545.
- Graf U, Abraham SK, Guzmán-Rincón J and Würgler FE (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 402:203–209.
- Graf U, Frei H, Kagi A and Katz AJ (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222:359-373.
- Graf U and Van Schaik N (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 271:59-67.
- Graf U, Spanó MA, Guzmán-Rincón J, Abraham SK and de Andrade HHR (1996). The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Afri News Occup Health Safety*, 6(1):9-13.
- Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6:153-188.
- Guzmán-Rincón J and Graf U (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth FM et al. (eds).

- Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental changes. Plenum Press, 169-181.
- Gürbüz M, Oral E, Kizilet H, Halici Z and Gulec M (2012). Genotoxic evaluation of selective serotonin-reuptake inhibitors by use of the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 748:17– 20.
- Idaomar M, Hamss R El, Bakkali F, Mezzoug N, Zhiri A, Baudoux D, Serrano AM, Liemans V and Moraga AA (2002). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 513:61–68.
- Joubert D and Bijlsma R (2010). Interplay between habitat fragmentation and climate change: inbreeding affects the response to thermal stress in *Drosophila melanogaster*. *Climate Res*, 43:57-70.
- Katzung, Bertram G., Susan B. Masters, and Anthony J. Trevor. 2012. Basic & clinical pharmacology. eBook : Document Computer File. English. 12ed. New York. NY 69-71.
- Keller-Seitz MU, Certa U, Sengstag C, Würzler FE, Sun M and Fasullo M (2004). Transcriptional Response of Yeast to Aflatoxin B1: Recombinational Repair Involving *RAD51* and *RAD1*. *Mol Biol Cell* 15:4321–4336.
- Lima AP and Pantaleão SM (2010). Avaliação mutagênica e antimutagênica do extrato aquoso de *Mimosa hostilis* (Benth) pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática em asas de *Drosophila melanogaster* (SMART). Dissertação de Mestrado, Biotecnologia em Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 32 pp.
- Lima CR, Costa-Silva JH, Lyra MMA, Araújo AV, Arruda VM, Dimech GS, Evêncio LB, Fraga MCCA, Lafayette SSL and Wanderley AG (2006). Atividade Cicatrizante e Estudo Toxicológico Pré-clínico do fitoterápico Sanativo®. *Acta Farmac Bonaerense*, 25(4):544-549.
- Lok, BH e Powell and SN (2012). Understanding the Role of Rad52 in Homologous Recombination for Therapeutic Advancement. *Clinical Cancer Research*, 18:6400–6406.
- Lucio Neto MP. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas. 2011.

(Dissertação de Mestrado em Ciências farmacêuticas) –Universidade Federal do Piauí.

- Loreto V, Cabrero J, Camacho J, Lopez-Leon M and Souza MJ (2008). Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. *Chromosome Research*, 16:233-241.
- Maenosono S, Suzuki T and Saita S (2007). Mutagenicity of water-soluble FePt nanoparticles in Ames test. *J Toxicol Sciences*, 32(5):575-579.
- Marshall PA (2007). Using *Saccharomyces cerevisiae* to Test the Mutagenicity of Household Compounds: An Open Ended Hypothesis-Driven Teaching Lab. *CBE – Life Sciences Education* 6:307-315.
- Matuo MCS, Kikuchi IS and Pinto TJA (2010). Evaluation of cytochrome P-450 concentration in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Braz. J. Pharm Sci*, 46(3).
- Mendanha DM, Ferreira HD, Felicio LP, Silva EM, et al. (2010). Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res*, 159(2):1153-62.
- Murakumo Y, Roth T, Ishii, H; Rasio, D; Numata, S; Croce and CM (2000). A Human REV7 Homolog That Interacts with the Polymerase ζ Catalytic Subunit hREV3 and the Spindle Assembly Checkpoint Protein hMAD2. **J Biol Chem**, 275(6)11:4391-4397.
- Nii H, Tsutsui M, Kondo J, Toyohira Y, Ueno S and Yanagihara N (2008). Copper, zinc-superoxide dismutase enhances the mutagenicity in *Salmonella typhimurium* induced by 2-amino-6-methyldipyrido [1,2-a:3',2'-d]imidazole. *Mutat Res*, 653(1-2):14-22.
- Orsolin PC, Silva-Oliveira RG and Nepomuceno JC (2012). Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol*, 50:2598–2604.
- Oshima-Franco Y and Franco LM (2003). Biotransformação: importância e toxicidade. *Rev Saúde*, 5(9):69-76.
- Paladino G, Weibel B and Sengstag C (1999). *Heterocyclic aromatic amines efficiently* induce mitotic recombination in metabolically competent *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Carcinogenesis*, 20(11):2143–2152.

- Pérez-Rivera AA, Hu T, Aardema MJ and Nash JF (2009). Evaluation of the genotoxicity of the imidazole antifungal climbazole: Comparison to published results for other azole compounds. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 672 (1):27-39.
- Pessoa WS, Estevão LGM, Simões RS, Barros MEG, Mendonça FS, Baratella-Evêncio L and Evêncio-Neto J (2012). Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina var. cebil*) in cutaneous wound healing in rats. *Acta Cirúrg Bra*, 27 (10):659-665.
- Pélabon C, Carter AJR, Hansen TF and Houlet D (2006). Response of fluctuating and directional asymmetry to selection on wing shape in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol*, 19:764-776.
- Pitta MGR et al (2006). New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101(1):313-316.
- Pitta IR, Lima MCA, Silva TG, Sudo GZ, Galdino SL, Sudo RT (2008). Compound with anesthetic activity, namely 3-benzylimidazolidine-2,4-dione and pharmaceutical compositions. *PCT Int. Appl.*, WO 2008134840 A2 20081113.
- Prakash L and Prakash S (1977) Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 86:33-55.
- Prakash S, Sung P and Prakash L (1993). DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, 27:33-70.
- Rand MD (2010). *Drosophotoxycology: the growing potential for Drosophila in neurotoxicology*. *Neurotoxicol Teratol*, 32(1):74.
- Rengifo ES and Vargas GA (2013). *Physalis angulate L. (Bolsa Mullaca): A Review of its Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology*. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas*, 12(5):431-445.
- Ribeiro IP and Galvão I (2010). Efeito genotóxico do etanol em neuroblastos de *Drosophila melanogaster*. *Rev Port Saúde Púb* 28(2):199-204.
- Ribeiro LR, Salvadori DMF and Marques EK (2003). *Mutagênese Ambiental*. Canoas – RS. ULBRA. 281- 300.
- Rodrigues F, Lehmann M, do Amaral VS, Reguly ML and de Andrade HH (2007). Genotoxicity of three mouthwash products, Cepacol, Periogard, and Plax, in the *Drosophila* wing-spot test. *Environ Mol Mutagen*, 48(8):644-9.

- Santos RA, Cabral TR and Cabral IR (2008). GEenotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. *Biocell*, 32(2): 195-200.
- Samad MB, Kabir A, Costa NM and Hannan JMA (2014). Ethanolic Extract of *Butea monosperma* Leaves Elevate Blood Insulin Level In Type 2 Diabetic Rats, Stimulate, Insulin Secretion in Isolated Rat Islets and Enhance Hepatic Glycogen Formation. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 14(1):1-13.
- Schild D (1995). Suppression of a New Allele of the Yeast *RAD52* Gene by Overexpression of *RAD51*, Mutations in *srs2* and *ccr4* , or Mating-Type Heterozygosity. *Genet Soc Am*, 140:115-127.
- Scholz H and Ramond J (2000). Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron*, 28:261–271.
- Sharma A, Shukla AK, Mishra M and Chowdhuri DK (2011). Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. *Mutat Res*, 721:142–146.
- Sudo RT, Calasans-Maia JÁ, Galdino SL, Lima MC, Zapata-Sudo G, Hernandez MZ and Pitta IR (2010). Interaction of morphine with a new alpha2-adrenoceptor agonist in mice. *J Pain*, 11(1):71-78.
- Valadares BLB, Graf U and Spanó MA (2008). Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol*, 46:1103–1110.
- Viana AJC and Souza MM (2010). Identification of the pattern of heterochromatin distribution in *Passiflora* species with C-banding. *Genet Mol Res* 9 (3):1908-1913.
- Weber Sobrinho CR (2010). Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos da casca do caule de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) Von Reis Alt. (angico-de-carço). Dissertação de mestrado. Recife.
- W.H.O. World Health Organization. International Program on Chemical Safety (IPCS) (2011). Cancer: Cancer prevention. Acesso em 25-07-11, em: <http://www.who.int/cancer/prevention/en/index.html#>.

- Wolkenberg SE, Wisnoski DD, Leister WH, Wang Y, Zhao Z and Lindsley CW (2004). Efficient Synthesis of Imidazoles from Aldehydes and 1,2-Diketones Using Microwave Irradiation. *Org Lett*, 6 (9):1453-1456.
- Yüksel M, Sarikaya R and Bostanci N (2010). Genotoxic evaluation of antiepileptic drugs by *Drosophila* somatic mutation and recombination test. *Food Chem Toxicol*, 48:2682–2687.

Apêndice A - The new compound pt-31 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione exhibits recombinogenic activity in *Drosophila melanogaster* SMART¹

Adiles Paulo de Lima^{a*}, José Ferreira dos Santos^a, Tania Tassinari Rieger^a, Ivan da Rocha Pitta^b, Marina Galdino da Rocha Pitta^b, Marcos Antonio de Moraes Junior^c

^aLaboratório de Experimentação em *Drosophila*, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil.

^bNúcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil.

^cLaboratório de Genética Molecular de Microrganismos, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil.

¹ Manuscrito submetido na revista Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis em agosto 2015.

Abstract

PT-31 [3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione] is a compound described with analgesic activity, and as a therapeutic product it requires additional tests before human applicability, including genetic assays. The Mutation and recombination Somatic Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* provides different sorts of mutations and recombination, and recombination and reversion mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, are both models that analyses genetic damages, they present low cost, reliability and speed, in order to assess a safer use of the compound. The PT-31 drug was evaluated by SMART technique which uses two types of crosses (ST and HB) and by the test with *S. cerevisiae* recombination and reversion mutants. It was noticed the mutagenic effect and recombinagenic activity of the drug in the SMART test, increasing the mutagenic effect by the metabolic activity of P450 system, and none phenotypic change in the test in *S. cerevisiae*. These data contribute to the expansion of information on the therapeutic compound in the literature, so that future experiments will be able to elucidate the action in living organisms.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, mutagenesis and therapeutic compound

1. Introduction

Imidazole drugs have attracted the medicinal chemists attention for their high therapeutic properties, and chemotherapeutic agents have been synthesized [1]. Those compounds, that are synthesized [2] or commonly found in pharmaceuticals and natural products [3], have broad range of medicinal properties such as anti-cancer, anti-bacterial, anti-fungal, anti-parasite and antioxidant [1]. Many of those chemicals have been developed for treatment of clinical disorders or for therapeutic purposes. In this regard, the PT-31 (3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione) is a new imidazolidine-derivative compound described as a dose-dependent analgesic that interacts with morphine and increases its effect [4]. It is related to the activation of α_2 -adrenoceptor promoting antinociceptive action. Although morphine has higher potency and intensity it presents side effects, so that its therapeutic combination with PT-31 would reduce the doses of each component without compromising the clinical effect [4]. As new drug testing for safety and efficacy by additional *in vitro* as *in vivo* studies is a paramount requisite for its commercialisation [5].

The International Agency for Research on Cancer (IARC) considers mutagenic chemicals in mammalian cells *in vivo* and *in vitro* as carcinogenic or probably carcinogenic to humans, and mutagenicity represents an important role in most carcinogen activities [2]. Thus, it is recommended by IARC the evaluation of pharmaceuticals and other chemicals for their putative carcinogenic effects in humans [6]. In this regard, well-established experimental approaches are in use for this massive testing on carcinogens, from the bacterial mutagenicity tests [2] to *Drosophila melanogaster* SMART [7].

The Somatic Mutation and Recombinogenic Test (SMART) employs the well-known genetics eukaryotic fruit fly *D. melanogaster* to assess mutagenic events that include point mutations, chromosome aberrations, gene conversion, and mitotic recombination [7]. It is

one-generation test built to assess loss of heterozygosity in suitable gene markers (recessive - *flr*³ and *mwh*) expressed on wings, after some mutant clones formation, in proliferative cells of the imaginal larvae discs [7,8]. This test presents advantages as being easy to manipulate and analyse, using fast and reliable genetic characters and detecting mutagenic, antimutagenic and recombinogenic potential of the chemicals tested [9, 7]. Moreover, it can also analyse the metabolic activation of promutagens and procarcinogens compounds due to the activity of cytochrome P450 complex in the flies [10, 7]. In addition, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* provides another way to investigate the genotoxic activity of drugs [11] due the extensive knowledge of the molecular mechanisms of DNA repair and the availability of mutant strains for these different repair mechanisms [12]. This organism is also recommended by The US Environmental Protection Agency as a model organism for genotoxicity evaluation [11] given its endogenous cytochrome P-450 complex [13].

In view of the information presented, this work aimed to investigate the potential of the pharmaceutical-relevance drug PT-31 to damage eukaryote DNA using *Drosophila melanogaster* SMART approach. The analysis was complemented by testing strains of *S. cerevisiae* with deletion to the three main DNA repair mechanisms. The results obtained may contribute to the evaluation of the potential genotoxic risks associated with the clinical use of PT-31.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

PT-31 3-(2-chloro-6-fluoro-benzyl)-imidazolidine-2,4-dione (Figure 1), an imidazole derivative with strong analgesic properties, was provided by the Division of Therapy

Innovation Prof. Suely Galdino (NUPIT SG) of the Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil (patent access PI0701016-8A2). The 3-alkylation of imidazolidine takes place in 2 steps: the 3-position is activated by formation of the sodium or potassium salt followed by condensation with 2-chloro-6-fluorobenzyl chloride in hot ethanol. The synthesis and the physico-chemical characteristics of the PT-31 were described by Sudo et al (2010) [4]. The drug was dissolved in sterile deionized water to 7.5 mg/mL and diluted 1:1 by serial dilution with the same diluent.

Doxorubicin (DXR) was used as positive control in assay SMART at concentration 0.125 mg/mL. It is described as a strong genotoxic agent of direct action, with mutagenic, clastogenic aneugenic activities and properties, but also presenting recombinogenic effect in the experiments of Valadares et al. (2008) [14]. Methyl Methane Sulphonate (MMS) was used as a positive control in yeast assay at concentration 0.5% (v/v). It is known that this concentration there has induction of DNA double-stranded breaks which is lethal to the cell unless the breaks are repaired [15].

2.2. SMART procedure

Three strains of *D. melanogaster* were used to assess the genotoxicity potential of PT-31 (Table 1). 1) *mwh* (*mwh*): *y; mwh j*, 2) *flare-3* (*flr³*) (*flr³/In(3LR)TM3, ri pp sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) and 3) *ORR; flare-3* (*ORR/ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri pp sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*).

Two types of crosses were made: 1) In the Standard (ST) cross, males *mwh* were used to fecundate virgin *flare-3* females; 2) in the high bioactivation (HB) cross, virgin *ORR flare-3* females were fecundated by *mwh* males [16]. Both crosses produced two progeny: marker-heterozygous (MH) flies (*mwh* *+/+ flare-3*) with wild-type wings and balancer-heterozygous (BH) flies (*mwh* *+/+ TM3 Bds*) offspring with serrate wings [17, 7].

Eggs of both crosses were collected within eight hours after the posture, in vials with special medium of live baker's yeast supplemented with sucrose. The eggs were let to hatch and develop at the room temperature (25°C). Individuals that reached 3rd larval stage (after 72 ±4 h) they were washed in trap water and used in the treatments.

The larvae were transferred to bottles containing 0.5 g of mashed potato flakes (commercial preparation sold by Yoki Foods Company SA, São Paulo, Brazil) as cultivation medium. The flakes were dissolved in 2 mL of deionized water (negative control medium), PT-31 solutions (test medium) or doxorubicin (DXR) solution at 0.125 mg/mL (positive control medium). The experiment was conducted with treatments in duplicate for the period of 48 hours at room temperature.

After treatments, the emergent adults of the MH and BH flies of both crosses were collected and stored in 70% ethanol. First, the wings of MH flies were removed and mounted on glass slides for optical microscope inspection at 400 X magnitude, where different patterns of mutant spots were quantified [10, 18]. Dorsal and ventral surfaces of the wings were analysed according to the presence of simple spots (*mwh* or *flr*³ phenotypes) or twin spots (*mwh* and *flr*³ clones in adjacent areas). Those somatic spots were produced as the product of induced loss of heterozygosity (LOH). Simple spots were the results of point mutation, chromosome aberration and somatic recombination, while twin spots appeared exclusively as the product of somatic recombination [19, 20].

Statistical analysis used Chi-square test [21] in an in-house computing platform to verify the significance of the phenotypical differences between test and negative control individuals. The Mann, Whitney or Wilcoxon nonparametric U test was further used to confirm/reject the positive diagnosis [22].

2.3. Yeast testing

Saccharomyces cerevisiae strains were used to complement the results obtained by SMART. The parental strains BY4741 (*MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) and BY4742 (*MATα his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) and its isogenic mutants *rad1Δ* and *rad10Δ* (deficient in nucleotide excision repair), *rev1Δ* and *rev7Δ* (deficient in mutagenic repair) and *rad52Δ* (deficient in recombinational repair) were used for cytotoxic assays. The strain MM10-2A (*MATa Gal1 leu2-3/112 lys1-1 his7-2 trp-289 ura3-52* genotype) was used as a mutagenic activity indicator by the reverse mutation test in the locus *lys1-1*. Yeast strains were cultivated in liquid YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) at 30°C for 24 hours with agitation of 180 rpm. Aliquots of the pre-cultures were used to inoculate fresh medium to initial concentration of 0.1 unit of cell density at 600 nm (2×10^6 cells/mL) and let to grow until reaching early exponential phase ($\sim 10^7$ cells/mL). Aliquots of 100 μL were transferred to microtubes. Cells were harvested by centrifugation and washed with sterile water for complete removal of the medium and finally suspended in 100 μL of the solution of PT-31 (test) or MMS (control) drugs. After incubating for one, three, five and 24 hours, cell suspensions were serially diluted and aliquots of 5 μL were dropped on solid YPD medium for growth inspection after two days of incubation at 30°C or on SC-lys medium (0.17% YNB, 0.5% ammonium sulphate, 20% glucose, plus the leucine, histidine, tryptophan

and uracil at 200 mg/mL) for testing the induction lysine reversion mutation after five days of incubation at 30°C.

3. Results and Discussion

Tables 1 and 2 showed that DXR showed positive result for all types of mutation spots (single spots - SS, large spots - LS and total spots – TS) as expected, as well as 59% and 69% of recombination in individuals with basal and increased activity of P450 complex, respectively. It indicated the reliability of the assay performed and the quality of the strains tested. Moreover, the low frequency of spots in the negative control with ultrapure water showed that neither the environmental condition nor the quality of the feeding medium affected the experiment. Regarding to PT-31, it was observed and statistically significant increasing in the number of spots with the increasing concentration of the drug from 1.875 mg/mL in the feeding medium.

Regarding to marker-heterozygous wings (*mwh/flr³*) it was observed the appearance of mutation spots from the three highest concentrations of the drug reported as number of TS and SS. The appearance of SS is indicative of DNA mutation taking place during recent events of cell division of the individuals, when the drug enter to the cells in the marginal disk and interact with DNA [19]. However, the absence of twin spots indicated that it is not possible PT-31 did not present itself a significant recombinogenic activity (Table 1). When using flies with high bioactivation (P450) activity it was possible to observe induction of mutation by the number of TS and SS, with additional detection of recombinogenic activity revealed by the inspection of balancer-heterozygous individuals (Table 2). Therefore, it can be suggested that *in vivo* activation of PT-31 can yield in an intermediary compound with recombinogenic activity. Previous unpublished studies performed by partner laboratories of

NUPIT SG evaluated the mutagenic, genotoxic, cytotoxic and toxic activities of PT-31 using assays based on chromosome alteration and breakdown by *Allium cepa*, comet and micronucleus assays. They revealed its small but significant genotoxic effect, which is now corroborated by the present work.

Mutagenic activity of gabapentin, a GABA-agonist with analgesic activity, was attested by SMART approach, attesting the efficacy of the assay in the measurement of genotoxic activity of this kind of compound drug [23]. The mechanism from which PT-31 produces its mutagenic effect, itself or by its bioconverted intermediary, deserves further investigations. However, it is known that imidazolic derivatives cause direct damage to DNA or by inhibiting some protein-protein interactions [24]. For example, the imidazolic-derivative CL₆₄₈₅₅ reported with anti-parasite activity was reported to induce point mutations in *Salmonella*/microsome test after metabolism by bacterial or mammal nitroreductases [25]. Recent work showed the mutagenic and recombinogenic potential of metronidazole, an imidazole-derivative with anti-bacterial activity, by *Drosophila* SMART [26]. Additionally, it was observed in the present study the bioactivation activity of the drug by cytochrome P450, as the PT-31 treatments increased their mutagenic activities at the high bioactivation cross (HB). Bioactivation is sometimes required to induce the genotoxic activity of some drugs. Spanó et al (2001) [27] showed the recombinogenic activity of *p*-dimethylamino azobenzene in HB crosses, presenting the need of this compound to be metabolised by the high bioactivation activity of P450 complex of the flies.

Following the positive results with the highest concentration of PT-31 drug in SMART (7.5 mg/mL), the effect of this drug as tested in yeast cells. Qualitative test showed that PT-31 had no effect on the growth of any of the yeast strains used (Data unpublished), indicating that this drug cannot cause significant damage to yeast DNA. Since this drug presented recombinogenic activity in *Drosophila*, it was expected that the possible damages leading to

recombination repair, either single or double strand breaks, could not be repaired in *rad52Δ* mutant, a strain lacking the most important gene of yeast recombination repair mechanism. Similarly, it was expected that cells lacking nucleotide excision repair mechanism (*rad1Δ* and *rad10Δ* mutants) were sensitive to the mutagenic effect of the drug. From these results, we could suggest that PT-31 is not properly metabolised by yeast enzyme to be converted to a genotoxic intermediate. Bioactivation of heterocyclic aromatic amines is the essential step for their mutagenic activity. It was only possible when genes encoding for three enzymes of the human P-450 complex were expressed in yeast cells [28]. It reinforces the fact that endogenous yeast enzymes are not capable of metabolising such compounds. On the other hand, *S. cerevisiae* cells were able to convert aflatoxin B1, an imidazole-derivative, into its weak mutagenic derivative that induced heteroallelic recombination and chromosome translocations [29]. Thus, the effectiveness of different drugs, even though they share chemical similarities, is very variable in yeast cells.

In conclusion, the present work showed the small but significant effect of PT-31 in causing mutations in *Drosophila* cells at the highest concentration tested. The recombinogenic activity of this drug was dependent on high metabolism by the flies, which seemed not possible by yeast enzymes. The level of this genotoxic effect does not seem, in principle, relevant when considering that the experiments were performed with drug concentration much lower than that precluded for its therapeutic use. However, further investigations using animal models are required to confirm the safety doses of this analgesic compound.

4. REFERENCES

- [1] Abdel-Wahab BF, Ghada EA and Badria FA (2011). Synthesis, antimicrobial, antioxidant, anti-hemolytic and cytotoxic evaluation of new imidazole-based heterocyclic. Elsevier Masson SAS.

- [2] Nii H, Tsutsui M, Kondo J, Toyohira Y, Ueno S and Yanagihara N (2008). Copper, zinc-superoxide dismutase enhances the mutagenicity in *Salmonella typhimurium* induced by 2-amino-6-methyldipyrido [1,2-a:3',2'-d]imidazole. *Mutat Res*, 653(1-2):14-22.
- [3] Alzieu T, Lehmann J, Naidu AB, Martin RE and Britton R (2014). Converting oxazoles into imidazoles: new opportunities for diversity-oriented synthesis. *Chem Comm*, 50:1867—1870.
- [4] Sudo RT, Calasans-Maia JÁ, Galdino SL, Lima MC, Zapata-Sudo G, Hernandez MZ and Pitta IR (2010). Interaction of morphine with a new alpha2-adrenoceptor agonist in mice. *J Pain*, 11(1):71-78.
- [5] Katzung, Bertram G., Susan B. Masters, and Anthony J. Trevor. 2012. Basic & clinical pharmacology. eBook : Document Computer File. English. 12ed. New York. NY 69-71.
- [6] Friedman GD, Jiang SF, Udaltsova N, Quesenberry CP Jr, Chan J, Habel LA (2009). Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity. *Int J Cancer* 125(9):2173-8. doi: 10.1002/ijc.24545.
- [7] Graf U, Abraham SK, Guzmán-Rincón J and Würgler FE (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 402:203–209.
- [8] Gürbüz M, Oral E, Kizilet H, Halici Z and Gulec M (2012). Genotoxic evaluation of selective serotonin-reuptake inhibitors by use of the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 748:17– 20.
- [9] Idaomar M, Hamss R El, Bakkali F, Mezzoug N, Zhiri A, Baudoux D, Serrano AM, Liemans V and Moraga AA (2002). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 513:61–68.
- [10] Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6:153-188.

- [11] Marshall PA (2007). Using *Saccharomyces cerevisiae* to Test the Mutagenicity of Household Compounds: An Open Ended Hypothesis-Driven Teaching Lab. CBE – Life Sciences Education 6:307-315.
- [12] Murakumo Y, Roth T, Ishii, H; Rasio, D; Numata, S; Croce and CM (2000). A Human REV7 Homolog That Interacts with the Polymerase ζ Catalytic Subunit hREV3 and the Spindle Assembly Checkpoint Protein hMAD2. J Biol Chem, 275(6):11:4391-4397.
- [13] Matuo MCS, Kikuchi IS and Pinto TJA (2010). Evaluation of cytochrome P-450 concentration in *Saccharomyces cerevisiae* strains. Braz. J. Pharm Sci, 46(3).
- [14] Valadares BLB, Graf U and Spanó MA (2008). Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Food Chem Toxicol, 46:1103–1110.
- [15] Chlebowicz E and Jachymczyk WJ (1979). Repair of MMS-Indueed DNA Double-Strand Breaks in Haploid Cells of *Saccharomyces cerevisiae*, which Requires the Presence of a Duplicate Genome. Genet. 167: 279 286.
- [16] Graf U, Frei H, Kagi A and Katz AJ (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. Mutat Res 222:359-373.
- [17] Felício LP, Silva EM, Ribeiro V, Miranda CT, Vieira ILBF, Passos DCS, Ferreira AKS, Vale CR, Lima DCS, Carvalho S and Nunes WB (2011). Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*: SMART/wing. Genet Mol Res 10 (1): 16-24.
- [18] Ribeiro LR, Salvadori DMF and Marques EK (2003). Mutagênese Ambiental. Canoas – RS. ULBRA. 281- 300.

- [19] Gusmán-Rincón J and Graf U (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth FM et al. (eds). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes. Plenum Press, 169-181.
- [20] Danesi CC, Dihl RR, Bellagamba BC, de Andrade HH, Cunha KS, Guimarães NN and Lehmann M (2012). Genotoxicity testing of combined treatment with cisplatin, bleomycin, and 5-fluorouracil in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 747: 228–233.
- [21] Frei H and Würzler FE (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res*, 203:297–308.
- [22] Cunha KS, Reguly ML, Graf U and Andrade HH (2001). Taxanes: the genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 16(1):79-84.
- [23] Yüksel M, Sarıkaya R and Bostancı N (2010). Genotoxic evaluation of antiepileptic drugs by *Drosophila* somatic mutation and recombination test. *Food Chem Toxicol*, 48:2682–2687.
- [24] Wolkenberg SE, Wisnoski DD, Leister WH, Wang Y, Zhao Z and Lindsley CW (2004). Efficient Synthesis of Imidazoles from Aldehydes and 1,2-Diketones Using Microwave Irradiation. *Org Lett*, 6 (9):1453-1456.
- [25] de Moraes Jr MA, Vlckova V, Fridrichova I, Slaninova M, Brozmanova J and Henriques JAP (1998). Effect of bacterial recA expression on DNA repair in the rad51 and rad52 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet Mol Biol* 21:3-9
- [26] Palermo AM, Mudry MD (2013). Metronidazole induced DNA damage in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Curr Drug Saf*, 8(3):195-8.

- [27] Spanó MA, Frei H, Würigler FE and Graf U (2001). Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, 16 (5): 385-394.
- [28] Paladino G, Weibel B and Sengstag C (1999). *Heterocyclic aromatic amines efficiently induce mitotic recombination in metabolically competent Saccharomyces cerevisiae strains*. *Carcinogenesis*, 20(11):2143–2152.
- [29] Keller-Seitz MU, Certa U, Sengstag C, Würigler FE, Sun M and Fasullo M (2004). Transcriptional Response of Yeast to Aflatoxin B1: Recombinational Repair Involving *RAD51* and *RAD1*. *Mol Biol Cell* 15:4321–4336.
- Lucio Neto MP. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas. 2011. (Dissertação de Mestrado em Ciências farmacêuticas) –Universidade Federal do Piauí. Unpublished results.

Table 1. Frequency of mutant spots obtained by SMART Standard Cross (ST) progeny of the marker-heterozygous (MH - *mwh/flr³*) and balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) individuals. Larvae chronic treatment with the concentrations of PT-31 (7.5, 3.75, 1.875, 0.94, 0.47, 0.234 e 0.117 mL/ mL), negative control (ultra distilled water) and positive control (Doxorubicin - DXR 0.125mg/mL)

Genotype and Treatment	Concentration [mg/mL]	Nr. of indiv ^a . (n)		Nr. of spots/fly ^b								Recombination (%)
				SS (1-2 cell) ^c		LS (1-2 cell)		TW		TM		
				m=2 ^d		m=5		m=5		m=2		
<i>mwh/flr</i> ³												
H ₂ O		21		0.24	(05)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.24	(05)	
PT-31	0.117	23		0.39	(09) i	0.00	(00) i	0.00	(00) i	0.39	(09) i	
PT-31	0.234	21		0.29	(06) i	0.10	(02) i	0.10	(02) i	0.48	(10) i	
PT-31	0.47	20		0.40	(08) i	0.10	(02) i	0.00	(00) i	0.50	(10) i	
PT-31	0.94	35		0.34	(12) i	0.00	(00) i	0.00	(00) i	0.34	(12) i	
PT-31	1.875	23		0.48	(11) i	0.13	(03) i	0.00	(00) i	0.61	(14) i	
PT-31	3.75	31		0.61	(19) +	0.00	(00) i	0.00	(00) i	0.61	(19) +	
PT-31	7.5	30		0.60	(18) +	0.00	(00) i	0.03	(01) i	0.63	(19) +	
DXR	0.125	76		1.87	(142) +	0.26	(20) +	0.11	(08) i	2.24	(170) +	
<i>mwh/TM3</i>												
H ₂ O		26		0.31	(08)	0.00	(00)	^e		0.31	(08)	^f

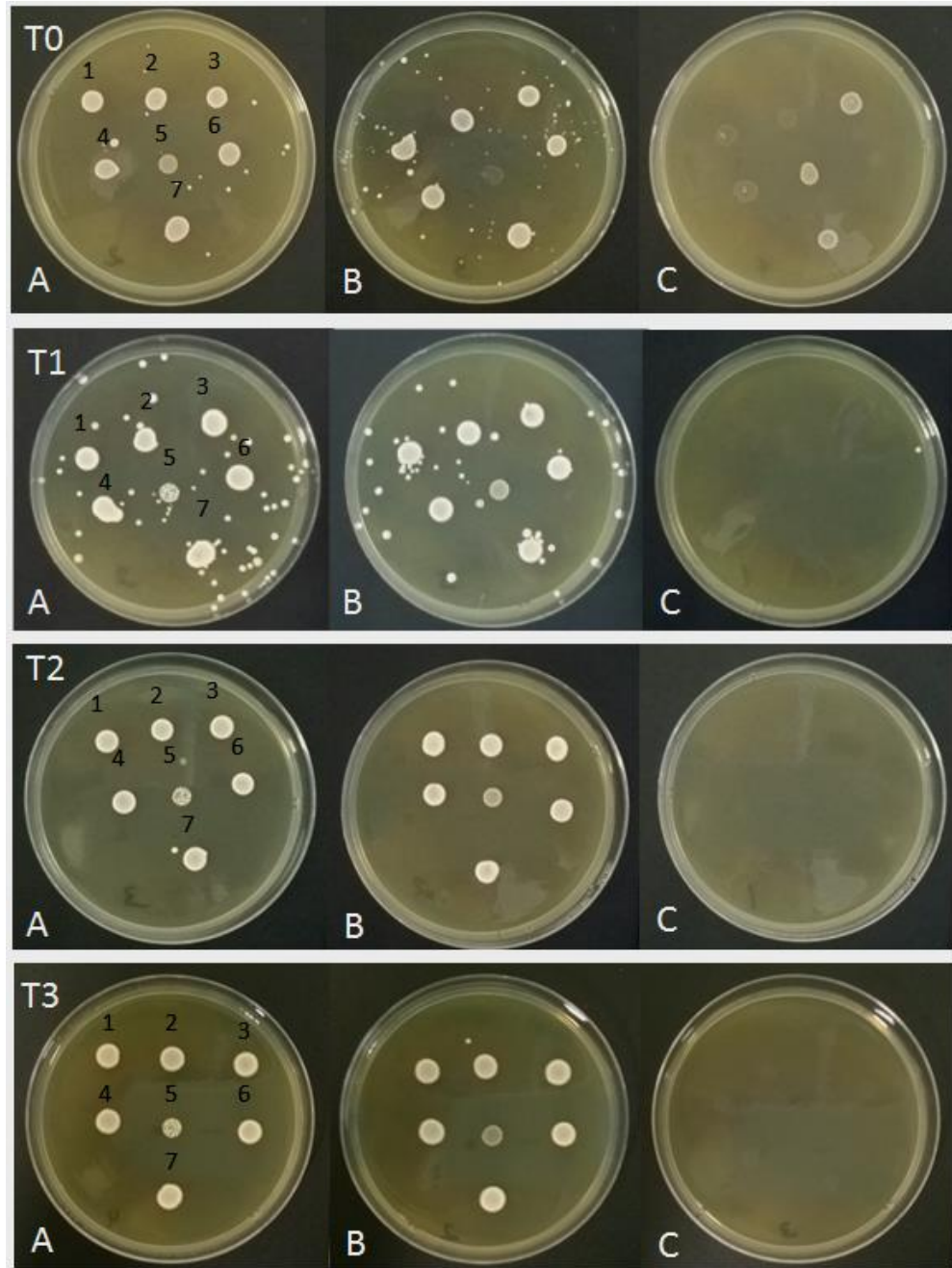
PT-31	1.875	30		0.33	(10) i	0.00	(00) i			0.33	(10) i	
PT-31	3.75	30		0.07	(02) -	0.00	(00) i			0.07	(02) -	
PT-31	7.5	19		0.37	(07) i	0.00	(00) i			0.37	(07) i	
DXR	0.125	69		0.77	(53) +	0.14	(10) +			0.91	(63) +	59.38

^a Maximum number of individuals obtained for the experiment. ^b Statistics by Freije Würzler (1988): +, positive; -, negative; i, inconclusive. ^c *m*, multiplication factor for the assessment of negative results. Level of significance $\alpha = \beta = 0,05$. ^d Rare single *flr*³ spots included, considering the *mwh* clones for single *mwh* spots and for twin spots (TW). SS – small single spot (*mwh* or *flr*³ isolated one to other); LS – large single spot (*mwh* ou *flr*³ isolated one to other); TS – total of spots. In *mwh/TM3* individuals only single *mwh* spots, as they have *TM3* balancer chromosome that it does not possess *flr*³ mutant gen. ^e Multiplication factor. ^f Nonexistent twin stains in *mwh/TM3* individuals. ^g Percentage of recombination between the frequency of total spots of *mwh/flr*³ and *mwh/TM3* individuals. SS - small single spot (*mwh* or *flr*³ isolated from each other); LS – large single spots (*mwh* or *flr*³ isolated from each other); TW – twin spots and TS – total spots. *mwh/TM3* individuals only have *mwh* spots, because they possess *TM3* balancer chromosome, which has absence of *flr*³ mutant gen.

Table 2. Frequency of mutant spots obtained by SMART High Bioactivation Cross (HB) progeny of the marker-heterozygous (MH - *mwh/flr³*) and balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) individuals. Larvae chronic treatment with the concentrations of PT-31 (7.5, 3.75, 1.875, 0.94, 0.47, 0.234 e 0.117 mL/ mL), negative control (ultra distilled water) and positive control (Doxorubicin - DXR 0.125mg/mL).

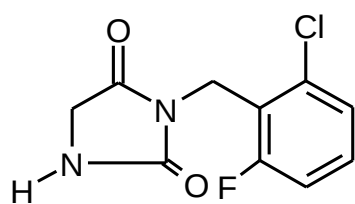
Genotype and Treatment	Concentration [mg/mL]	Nr. of indiv. (n)		Nr. of spots/fly								Recombination (%)
				SS (1-2 cell) m=2		LS (1-2 cell) m=5		TW m=5		TM m=2		
<i>mwh/flr</i> ³												
H ₂ O		16		0.56	(09)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.56	(09)	
PT-31	0.117	16		0.63	(10) i	0.13	(02) i	0.00	(00) i	0.75	(12) i	
PT-31	0.234	22		0.82	(18) i	0.09	(02) i	0.00	(00) i	0.91	(20) i	
PT-31	0.47	11		0.55	(06) i	0.00	(00) i	0.00	(00) i	0.55	(06) i	
PT-31	0.94	14		1.14	(16) i	0.00	(00) i	0.00	(00) i	1.14	(16) i	
PT-31	1.875	22		1.00	(22) i	0.14	(03) i	0.00	(00) i	1.14	(25) +	
PT-31	3.75	19		0.84	(16) i	0.11	(02) i	0.00	(00) i	0.95	(18) i	
PT-31	7.5	15		1.47	(22) +	0.00	(00) i	0.07	(01) i	1.53	(23) +	
DXR	0.125	59		2.32	(137) +	0.37	(22) +	0.07	(04) i	2.76	(163) +	
<i>mwh/TM3</i>												
H ₂ O		28		0.25	(07)	0.00	(00)			0.25	(07)	

PT-31	1.875	18		0.61	(11) +	0.00	(00) i			0.61	(11) +	46.49
PT-31	7.5	11		1.18	(13) +	0.00	(00) i			1.18	(13) +	22.87
DXR	0.125	45		0.58	(26) +	0.27	(12) +			0.84	(38) +	69.57



Treatment of yeast with PT-31 drug. YPD medium with yeast strains, respectively, 1, BY4742; 2 *Δrad1*; 3 *Δrad10*; 4 *Δrad52*; 5, *Δrev7*; 6, *Δrev1* and 7, BY4741, in different times: T0, 0 hour; T1, 1 hour; T2, 3 hours and T3, 24 hours. The treatments: A, ultra distilled water (negative control - NC); B, PT-31 solution and C, MMS (positive control - PC) (Source: the author, 2014).

1.



Apêndice B

Elsevier Editorial System(tm) for Mutation Research - Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: The new analgesic compound PT-31 (3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione) exhibits recombinogenic activity in *Drosophila melanogaster* SMART

Article Type: Research Paper

Keywords: *Drosophila melanogaster*; *Saccharomyces cerevisiae*; Mutagenesis; Recombinogenesis; Therapeutic compound

Corresponding Author: Prof. Marcos Antonio de Moraes Jr, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Pernambuco

First Author: Adiles P Lima, PhD

Order of Authors: Adiles P Lima, PhD; José F dos Santos, PhD; Tania T Rieger, PhD; Ivan R Pitta, PhD; Marina Galdino R Pitta, p; Marcos Antonio de Moraes Jr, PhD

Abstract: PT-31 [3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione] is a compound described with analgesic activity, and as a therapeutic product it requires additional tests before human applicability, including genetic assays. The Mutation and recombination Somatic Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* provides different sorts of mutations and recombination, and recombination and reversion mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, are both models that analyses genetic damages, they present low cost, reliability and speed, in order to assess a safer use of the compound. The PT-31 drug was evaluated by SMART technique which uses two types of crosses (ST and HB) and by the test with *S. cerevisiae* recombination and reversion mutants. It was noticed the mutagenic effect and recombinogenic activity of the drug in the SMART test, increasing the mutagenic effect by the metabolic activity of P450 system, and none phenotypic change in the tests with *S. cerevisiae*. These data contribute to the expansion of information on this therapeutic compound in the literature, so that future experiments will be able to elucidate its action in living organisms.

Suggested Reviewers: Júlio C Nepomuceno PhD
professor, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia
nepomuceno@ufu.br
Specialist in SMART for testing genotoxic activity of drugs and food additives:

Orsolin et al Food Chem Toxicol. 2015 Jul;81:111-9. doi: 10.1016/j.fct.2015.04.004

Lopes et al Genet Mol Biol. 2015 Mar;38(1):101-6. doi: 10.1590/S1415-475738120140154

Mehmet Gurbuzel PhD
professor, Biology, Erzincan University
mehmetgurbuzel@hotmail.com
Specialist in SMART for evaluation of genotoxic activity of pharmaceutical compounds:

Koksal and Gürbüzol Environ Toxicol Pharmacol. 2015 Mar;39(2):628-34. doi: 10.1016/j.etap.2014.12.010

Gürbüzol et al Toxicol Ind Health. 2014 May;30(4):376-83. doi: 10.1177/0748233712456091

Gürbüzol et al Mutat Res. 2012 Oct 9;748(1-2):17-20. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.06.004

Martin E Rainer PhD

researcher, Pharma Research & Early Development, F. Hoffmann-La Roche AG

rainer_e.martin@roche.com

Works on synthesis of imidazole-derivative drugs:

Alzieu et al Chem Commun (Camb). 2014 Feb 21;50(15):1867-70. doi: 10.1039/c3cc48467j