INSTITUTO FEDERAL
Rio de Janeiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Campus Realengo

Curso de Graduação em Farmácia

Letícia Mota Candal de Matos

Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade de complexos metálicos de azóis com atividade anti-*Sporothrix* spp.

Rio de Janeiro
2023.1

LETÍCIA MOTA CANDAL DE MATOS

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS METÁLICOS DE AZÓIS COM ATIVIDADE ANTI-*SPOROTHRIX* spp.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadoras: M. Sc. Bárbara Verena Dias Galvão (UERJ) e Profª Drª Débora Leandro Rama Gomes (IFRJ)

Rio de Janeiro
2023

LETÍCIA MOTA CANDAL DE MATOS

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS METÁLICOS DE AZÓIS ANTI-*SPOROTHRIX* spp.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Data da aprovação: 30/06/2023.

Banca Examinadora:

Bárbara Verena Dias Galvão

M. Sc. Bárbara Verena Dias Galvão
(Orientadora Externa – UERJ)

Profª Drª Débora Leandro Rama Gomes
(Orientadora Interna – IFRJ)

Drª Luana Pereira Borba dos Santos
(Membro Externo da Banca – UFRJ)

Lizandra Vitória de Souza Santos

M. Sc. Lizandra Vitória de Souza Santos
(Membro Externo da Banca – UERJ)

Rio de Janeiro
2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio e Ialle, por todo amor, carinho, dedicação, apoio e sacrifícios durante a minha caminhada. Os amo incondicionalmente e nunca serei capaz de descrever o quanto sou grata por tê-los comigo. Mesmo quando duvidei de mim, vocês foram a minha âncora e sempre confiaram no meu potencial. Obrigada por tudo o que fizeram e fazem por mim, sem nunca medir esforços.

À minha tia, Fernanda, por todo cuidado e zelo, por todas as conversas e risadas quando mais precisei. Mais que minha tia, sempre foi uma amiga e sem ela eu talvez não teria iniciado essa jornada. Amo você.

Ao Gabriel, por ser meu melhor amigo, me acalmar e confortar nessa reta final, sempre disposto a me ouvir, ajudar e aconselhar. Obrigada por todos os cafés e paciência em momentos de surto. Te amo!

À Ellen, Isabella, Nicolly e Thamires, por terem trilhado esse caminho comigo, com quase sempre muito bom humor, tornando-o mais leve e contribuindo na minha formação no aspecto profissional e pessoal. Compartilhar as alegrias e frustrações com vocês tornou tudo mais fácil. Agradeço ao IFRJ por ter me proporcionado fazer amizades que levarei para a vida.

À Bárbara e Débora, por todo ensinamento, paciência, dedicação, disposição e comprometimento com a minha formação. Grande parte deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração de vocês. Obrigada por todo incentivo tornando esse trabalho possível.

Ao LabMut, Carlos e Israel, por terem me acolhido tão bem e fazerem com que eu me apaixonasse pela ciência. É um caminho difícil, trabalhoso, cansativo, mas que vale a pena e graças a vocês foi uma experiência mais que enriquecedora. Obrigada pela oportunidade de aprender e crescer profissionalmente em um laboratório de referência com uma equipe tão comprometida.

Aos grupos da Profª Drª Sônia Rozental e Luana Borba do Laboratório de Biologia de Fungos da UFRJ e grupo da Profª Drª Maribel Navarro e do Prof. Dr. José Azevedo-França do Departamento de Química da UFJF por terem cedido as amostras analisadas nessa pesquisa.

À Faperj, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição e contribuição.

MATOS, L. M. C. **Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade de complexos metálicos de azóis com atividade anti-*Sporothrix* spp**. 36p. Trabalho de conclusão de curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

RESUMO

A esporotricose, causada por fungos do gênero *Sporothrix,* é uma zoonose de alta incidência em regiões tropicais, sendo endêmica no Brasil, principalmente no Estado do Rio de Janeiro. Embora essa micose subcutânea seja uma doença reconhecida há mais de um século, ainda possui poucas opções de tratamento, frequentemente associadas a casos de resistência e falha terapêutica, ademais dos diversos efeitos adversos e restrições. Desta forma, a pesquisa sobre novas opções quimioterápicas se faz necessária, buscando agentes mais seguros e eficazes para o tratamento da doença. Estudos recentes têm investigado a ação de derivados azólicos complexados a metais de transição, buscando observar um efeito sinérgico nessa combinação, potencializando a ação do fármaco. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a mutagenicidade e citotoxicidade *in vitro* dos complexos metal-azol MNJA-77 e MN-R10V2, visando identificar uma alternativa terapêutica potencial de maior seletividade para a esporotricose. O potencial mutagênico foi avaliado através do teste de Ames, na presença e ausência de ativação metabólica, nas cepas TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA1535 de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Para avaliação do potencial citotóxico foram empregadas linhagens celulares de hepatocarcinoma humano HepG2 e fibroblastos embrionários de camundongo BALB/3T3 clone A31 nos ensaios de WST-1 e LDH. Na presença de ativação metabólica, o composto MNJA-77 induziu citotoxicidade nas concentrações a partir de 0,05 µM para TA1535, concentrações de 0,5 e 5 µM para TA97a e na concentração de 5 µM para TA98. Para o composto MN-R10V2, na presença de ativação metabólica, foi possível observar citotoxicidade na concentração de 5 µM para cepa TA100 e nas concentrações a partir de 0,005 µM para TA97a. MN-R10V2 também induziu citotoxicidade na ausência de ativação metabólica, apenas na concentração de 5 µM para a cepa TA97a. Os ensaios realizados com os complexos MNJA-77 e MN-R10V2 mostraram que não houve detecção de mutagenicidade em nenhuma das cepas avaliadas na presença e ausência de ativação metabólica. Também não foram observados comportamentos dose-dependentes significativos para citotoxicidade. De forma geral, o complexo MN-R10V2 se mostrou mais citotóxico nos ensaios de WST e LDH. Eventos citotóxicos foram mais observados nos ensaios de LDH, sugerindo dano por rompimento de membrana celular ou alteração de permeabilidade celular, mais relacionada a necrose. Em síntese, os compostos não apresentaram indícios de genotoxicidade e hepatotoxicidade em baixas concentrações, indicando os complexos metálicos como candidatos promissores na busca de antifúngicos mais seletivos para o tratamento da esporotricose.

Palavras-chave: Esporotricose. Derivados azólicos. Complexos metálicos. Citotoxicidade. Mutagenicidade.

MATOS, L. M. C. **Mutagenicity and cytotoxicity assessment of metal-azoles complexes with anti-*Sporothrix* spp. activity.** 36p. Trabalho de conclusão de curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

ABSTRACT

Sporotrichosis, caused by fungi of the genus Sporothrix, is a zoonosis of high incidence in tropical regions, being endemic in Brazil, mainly in the State of Rio de Janeiro. Although this subcutaneous mycosis is a disease recognized for more than a century, it still has few treatment options, often associated with cases of resistance and therapeutic failure, in addition to the various adverse effects and restrictions. Thus, research on new chemotherapeutic options is necessary, seeking safer and more effective agents for the treatment of the disease. Recent studies have investigated the action of azole derivatives complexed with transition metals, seeking to observe a synergistic effect in this combination, potentiating the action of the drug. Therefore, this work aimed to evaluate the in vitro mutagenicity and cytotoxicity of metal-azole complexes MNJA-77 and MN-R10V2, in order to identify a potential therapeutic alternative of greater selectivity for sporotrichosis. The mutagenic potential was evaluated using the Ames test, in the presence and absence of metabolic activation, in strains TA97a, TA98, TA100, TA102 and TA1535 of Salmonella enterica serovar Typhimurium. To evaluate the cytotoxic potential, human hepatocarcinoma cell lines HepG2 and mouse embryonic fibroblasts BALB/3T3 clone A31 were employed in the WST-1 and LDH assays. In the presence of metabolic activation, compound MNJA-77 induced cytotoxicity at concentrations starting from 0.05 μM for TA1535, concentrations of 0.5 and 5 μM for TA97a and at concentration of 5 μM for TA98. For the compound MN-R10V2, in the presence of metabolic activation, it was possible to observe cytotoxicity at a concentration of 5 μM for strain TA100 and at concentrations from 0.005 μM for TA97a. MN-R10V2 also induced cytotoxicity in the absence of metabolic activation, only at a concentration of 5 μM for strain TA97a. The assays performed with MNJA-77 and MN-R10V2 complexes showed that no mutagenicity in any of the strains evaluated in the presence and absence of metabolic activation. Also, no significant dose-dependent behaviors were observed for cytotoxicity. In general, the MN-R10V2 complex was more cytotoxic in WST and LDH assays. Cytotoxic events were more observed in LDH assays, suggesting damage by cell membrane disruption or alteration of cell permeability, more related to necrosis. In summary, the compounds did not show evidence of genotoxicity and hepatotoxicity at low concentrations, indicating the metal complexes as promising candidates in the search for more selective antifungals for the treatment of sporotrichosis.

Keywords: Sporotrichosis. Azole derivatives. Metal complexes. Citotoxicity. Mutagenicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO……... 7

1.1 OBJETIVOS…….……..... 16

1.1.1 Objetivo geral…….…… 16

1.1.2 Objetivos específicos…….…… 16

2 DESENVOLVIMENTO…….…….. 17

2.1 METODOLOGIA…….…… 17

2.1.1 Compostos..... 17

2.1.2 Ensaio de mutagenicidade…….…….....17

2.1.3 Ensaios de citotoxicidade……...……19

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO……..……..…… 21

3 CONCLUSÃO…….... 31

REFERÊNCIAS……..... 32

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são um grupo de doenças tropicais endêmicas, especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e América Latina. Essas doenças são aquelas causadas por agentes infecciosos, como protozoários, bactérias e vírus, além de parasitas e fungos, e são consideradas endêmicas em populações de vulnerabilidade socioeconômica (FIOCRUZ, [s.d.]). Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), existem mais de vinte patologias enquadradas nesse grupo, presentes nas Américas, e elas são ditas negligenciadas, pois estão fora do campo de investimento de pesquisas e do desenvolvimento de tratamentos e prevenções, embora possuam alto índice de mortalidade (OPAS, 2022).

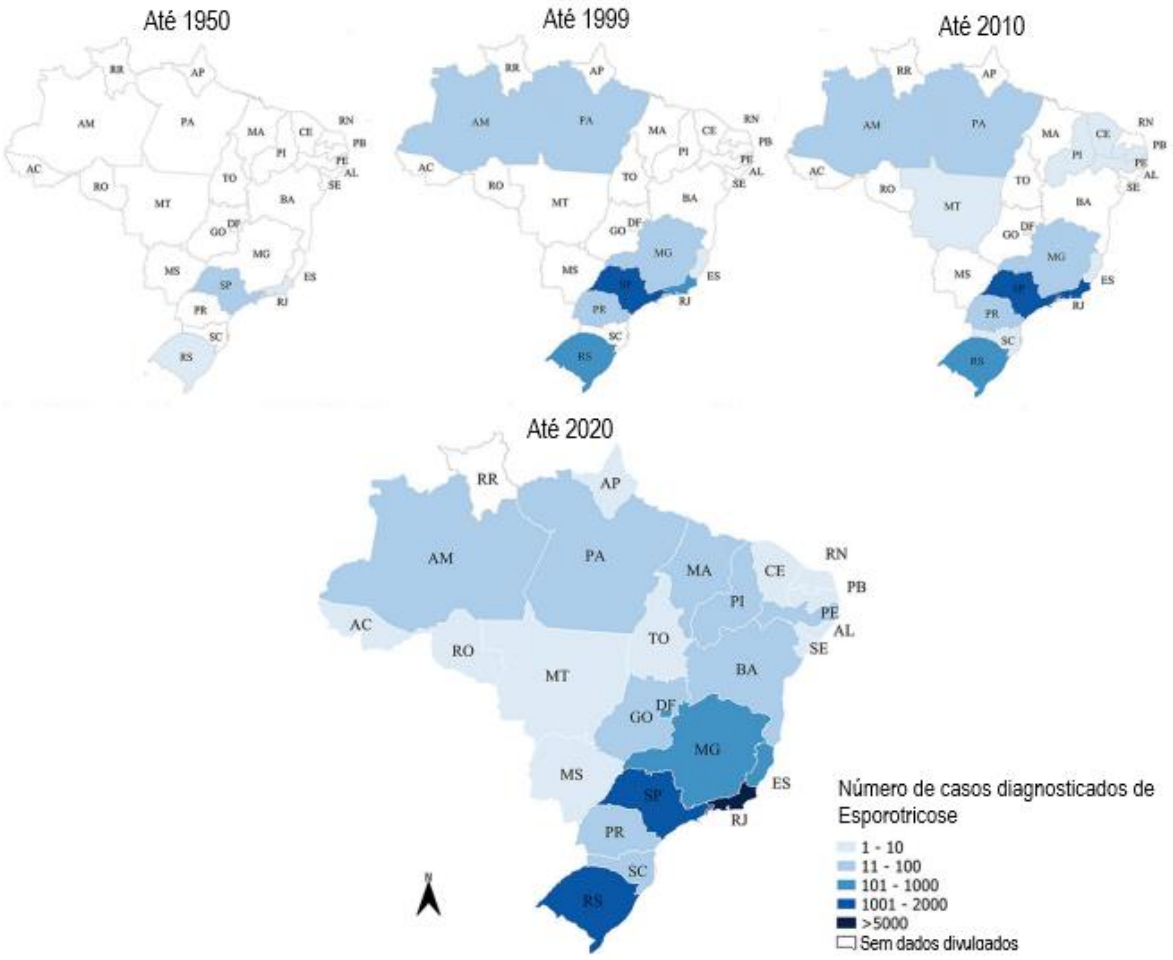
Dentre essas doenças está a esporotricose, a micose subcutânea humana mais frequente no mundo, causada por fungos do gênero *Sporothrix*, podendo acometer também animais, principalmente gatos (OMS, 2023). O primeiro relato clínico dessa infecção se deu no final dos anos de 1800, nos Estados Unidos, e seu primeiro caso no Brasil foi em 1907 (RODRIGUES *et al.*, 2020). No início, era muito associada a trabalhadores rurais, jardineiros e agricultores, por serem pessoas que lidam constantemente com o solo, onde pode haver contato com material biológico contaminado. Atualmente, essa segregação espacial já não existe mais, sendo observadas notificações da doença em grandes centros urbanos (CABAÑES, 2020).

Essa doença acomete pessoas por todo o mundo, tendo maior incidência em regiões tropicais, pois essa espécie é termodimórfica, tem sua temperatura ideal em torno de 25ºC para sua forma micelial e de 37ºC para a forma de levedura, havendo a conversão da primeira para a segunda forma apenas no hospedeiro. No Brasil, a maior parte dos casos se concentra na região sudeste, devido ao aspecto sazonal de clima quente e úmido (LARSSON, 2011). Diferentes fungos do gênero *Sporothrix* podem causar a enfermidade, porém a espécie *S. schenckii* é um dos patógenos de maior relevância na América Latina, enquanto a *S. brasiliensis* é o maior agente causador da doença no Brasil (RODRIGUES *et al.,* 2022).

A transmissão zoonótica de gatos infectados para humanos ou outros gatos e animais tem sido amplamente caracterizada, sendo altamente prevalente no Brasil, com mais de 5.000 casos diagnosticados, de 1960 até 2020, somente no estado do Rio de Janeiro (Figura 1) (RABELLO *et al.*, 2021). A esporotricose zoonótica é atualmente endêmica no Brasil, principalmente no Estado do Rio de Janeiro, e está

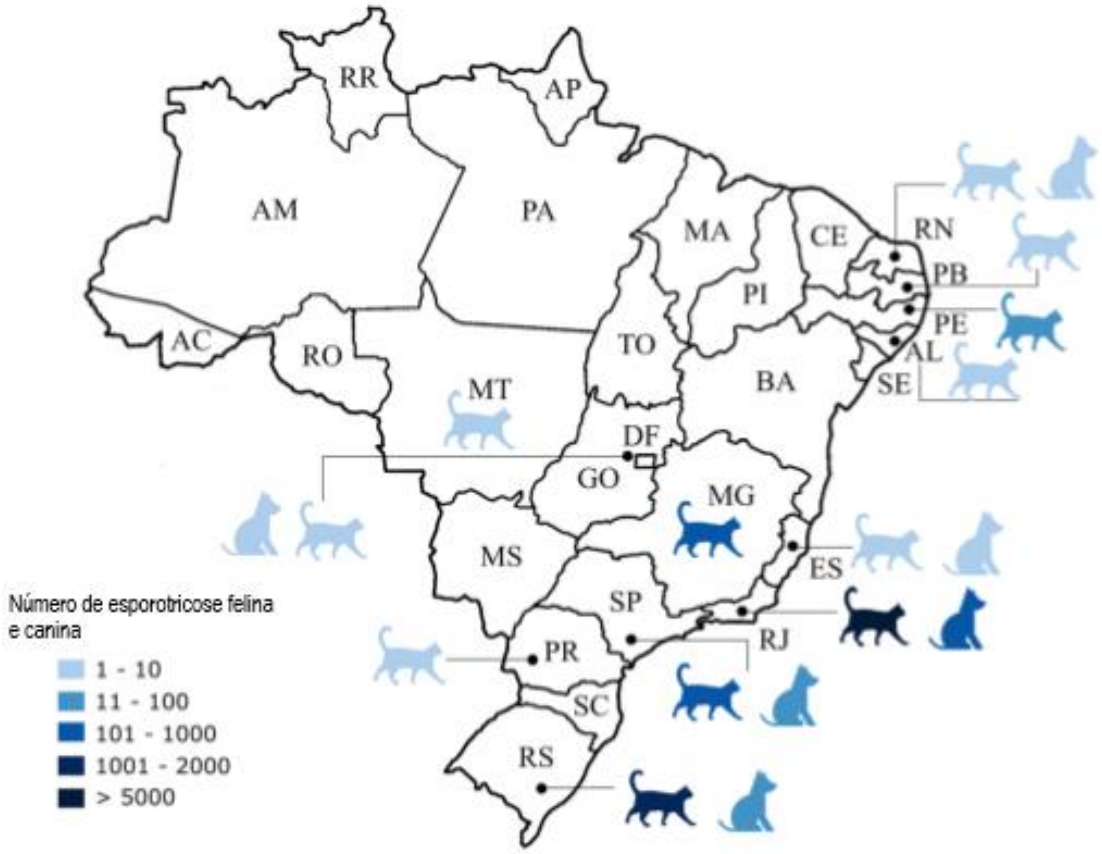
se expandindo para outros países da América Latina (Figura 2) (GREMIÃO *et al*., 2020).

Figura 1 — Distribuição de casos diagnosticados de esporotricose em humanos no Brasil até 2020.



Fonte**:** Adaptado de RABELLO *et al.*, 2021.

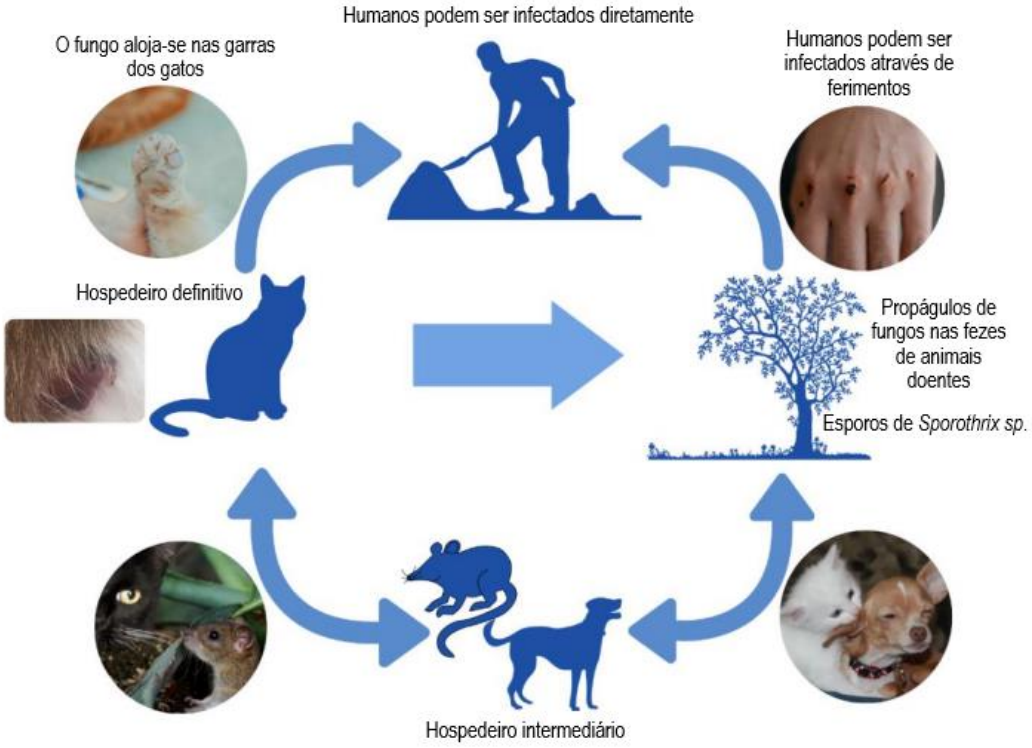
Figura 2 — Distribuição de casos diagnosticados em animais domésticos no Brasil até 2020.



Fonte: Adaptado de RABELLO *et al.*, 2021.

Durante seu ciclo biológico, os fungos dessa espécie apresentam duas formas, a micelial, encontrada no ambiente, e a levedura, sendo esta a responsável por causar a infecção em humanos e animais. Os indivíduos geralmente adquirem a infecção pela implantação do fungo na pele ou mucosa por meio de um trauma decorrente de acidentes com espinhos, palha ou lascas de madeira; contato com vegetais em decomposição, havendo então a infecção a partir da forma filamentosa que irá se converter em levedura no hospedeiro; ou arranhadura ou mordedura de animais doentes, sendo o gato o agente transmissor mais comum, havendo a infecção direta da forma de levedura (Figura 3) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Figura 3 — Ciclo evolutivo da esporotricose.



Fonte: Adaptado de ALVAREZ; OLIVEIRA; PIRES, 2022.

A esporotricose apresenta diferentes formas clínicas, sendo elas: cutânea (caracterizada por uma ou mais lesões); linfocutânea (formação de pequenos nódulos na camada mais profunda da pele); extracutânea (quando a doença se espalha para outros locais do corpo, como ossos, mucosas, entre outros, sem comprometimento da pele) e disseminada (quando a doença se dissemina para outros locais do organismo, com comprometimento de vários órgãos e/ou sistemas). A forma clínica mais frequente é a linfocutânea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Os casos mais severos da doença, na forma disseminada, acometem principalmente pacientes coinfectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) com quadro de baixa nos níveis de linfócitos T CD4 (FREITAS *et al*., 2014). Falcão *et al.* (2019) analisaram óbitos relacionados à esporotricose no Brasil de 1992 a 2015 e observaram que dos 65 óbitos reportados, 21 foram diretamente relacionados à coinfecção com HIV.

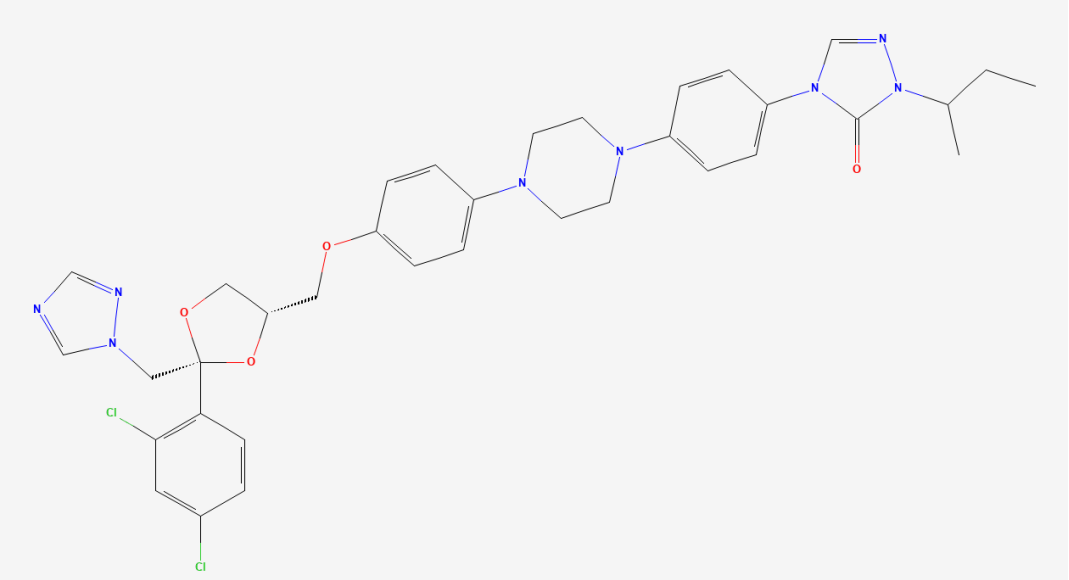
Qualquer pessoa que tenha contato frequente com animais, principalmente gatos, se encaixa no grupo de risco, como donos de gatos, veterinários e funcionários de *pet shops*. Nos animais, as formas clínicas mais comuns são múltiplas lesões cutâneas com envolvimento da mucosa, sobretudo a mucosa nasal (SCHUBACH *et*

al., 2004).

Após a infecção, o período de incubação pode variar de três dias até seis meses, com média de três semanas. A esporotricose humana pode ser diagnosticada por meio de uma correlação entre dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. A confirmação diagnóstica laboratorial é feita por meio do isolamento do fungo obtido de material de biópsia ou aspirado de lesões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

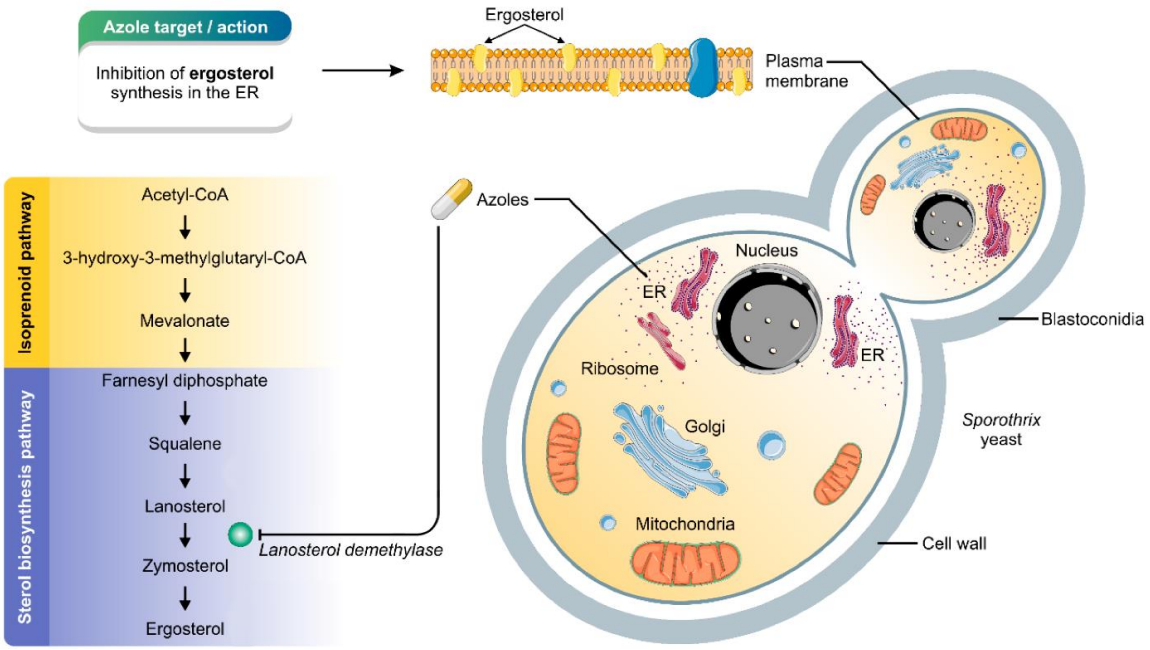
O tratamento de primeira escolha para a esporotricose é o itraconazol, um derivado triazólico de primeira geração que exerce atividade fungistática (Figura 4). Seu mecanismo de ação se dá por meio da inibição da síntese de ergosterol, um componente da membrana celular dos fungos, através da inibição da enzima C14-α-lanosterol demetilase. Tal inibição gera um acúmulo de esteróis malformados que levam à alteração da permeabilidade e fluidez das membranas biológicas, afetando a citocinese e o crescimento celular (Figura 5) (EUROFARMA, 2018; LEPESHEVA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.,* 2022).

Figura 4 — Estrutura química 2D do itraconazol.



Fonte: PUBCHEM, 2023.

Figura 5 — Mecanismo de ação dos azóis.



Legenda: Cell wall – Parede celular. Plasma membrane – Membrana plasmática. Azoles – Azóis. *Sporothrix* yeast – Levedura de *Sporothrix*. ER – Retículo endoplasmático. Nucleus – Núcleo. Mitochondria – Mitocôndria. Ribosome – Ribossomo. Quadro superior: Inibição da síntese de ergosterol no retículo endoplasmático. Fonte: RODRIGUES *et al.,* 2022.

A duração do tratamento pode variar de três a seis meses, ou mesmo um ano, até a cura do indivíduo. Seu uso traz muitos efeitos adversos, como perda parcial ou total da audição, neuropatia, falta de apetite, náusea, visão turva, icterícia; advertências a pacientes cardíacos, com insuficiência hepática e renal, idosos, gestantes, imunocomprometidos e interação com diversos fármacos (RODRIGUES *et al.,* 2022). Além disso, estudos apontam que casos de falha na terapia com esse medicamento podem estar relacionados ao desenvolvimento de mecanismos de resistência, porém estes processos ainda não estão completamente elucidados (WALLER *et al*., 2021).

Outra problemática relacionada a este medicamento, foi descrita em estudo da avaliação histopatológica de ratos com lesão hepática induzida por itraconazol, onde foi possível observar degeneração nos hepatócitos do fígado, hiperplasia do ducto biliar, dentre outros eventos, além de morte celular por necrose e apoptose. O mecanismo mais provável de dano é o estímulo do estresse oxidativo (SOZEN *et al*., 2014). Em outros estudos *in vivo*, com ratas fêmeas grávidas, avaliou-se os mecanismos de embriotoxicidade e teratogenicidade do itraconazol em diferentes

períodos gestacionais e foi observada a indução de genotoxicidade e hepatotoxicidade, tanto nas mães quanto nos fetos, além de teratogenicidade (EL-SHERSHABY *et al*., 2013, 2015).

No Brasil, temos como outras opções de tratamento a terbinafina e o iodeto de potássio, de administração oral, e a anfotericina B, de administração intravenosa. A terbinafina, uma alilamina de amplo espectro contra fungos patogênicos da pele, é a segunda linha de tratamento para as formas cutânea e linfocutânea, enquanto a anfotericina B isolada, antibiótico antifúngico poliênico, é empregada em formas invasivas e disseminadas da doença (KAUFFMAN *et al*., 2007). O iodeto de potássio possui atividade imunomodulatória, uma vez que suprime a produção de toxinas e apresenta efeito anti-inflamatório, sendo ainda muito utilizado na forma cutânea da doença, tanto em humanos quanto em felinos, associado ou não ao uso de itraconazol, apesar de apresentar efeitos adversos, como náusea e erupções cutâneas (RODRIGUES *et al.,* 2022).

Embora seja uma doença conhecida há mais de um século e de alta incidência em vários países, as opções de tratamento para a esporotricose permanecem restritas e, em geral, a quimioterapia atual apresenta uma série de complicações, como a extensa duração, alto custo, isolados resistentes e toxicidade (SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2022). Sendo assim, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas se faz necessário, buscando maior segurança para o paciente, economia para o sistema de saúde e contenção da atual epidemia no Brasil (RODRIGUES *et al.,* 2020).

Estudos recentes têm investigado a utilização de imidazóis e triazóis como alternativas terapêuticas sintéticas para doenças negligenciadas como a leishmaniose, doença de Chagas e esporotricose (MELLO *et al*., 2020). Uma estratégia que vem sendo explorada na área é combinar derivados azólicos (clotrimazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol) a metais de transição para observar se os complexos metálicos formados apresentam um efeito sinérgico, potencializando a ação do fármaco. Baseado na literatura, de forma geral, esses complexos são sintetizados a partir da complexação dos derivados azólicos anteriormente mencionados com o complexo ou sal metálico, através da doação de elétrons do fármaco bioativo (base de Lewis) para o centro metálico (ácido de Lewis) (GAGINI *et al*., 2018; AZEVEDO-FRANÇA, 2019; AZEVEDO-FRANÇA *et al.,* 2020, 2021; NAVARRO *et al.*, 2021).

Resultados preliminares mostraram que complexos metal-azol apresentaram

atividades antifúngicas muito promissoras frente a *S. brasiliensis e S. schenckii* (AZEVEDO-FRANÇA, 2019; AZEVEDO-FRANÇA *et al.,* 2020, 2021), demonstrando melhor eficácia e necessidade de menores doses para atingir o objetivo terapêutico quando comparados a outros azóis isolados, incluindo o itraconazol, estimulando investigações para aprofundar o conhecimento acerca da eficácia e segurança dessas moléculas. Estudos também comprovaram a suscetibilidade de biofilme maduro de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* a sais de prata, inibindo sua viabilidade em 100% e se mostrando mais eficaz que o itraconazol isolado (BORBA-SANTOS *et al*., 2022).

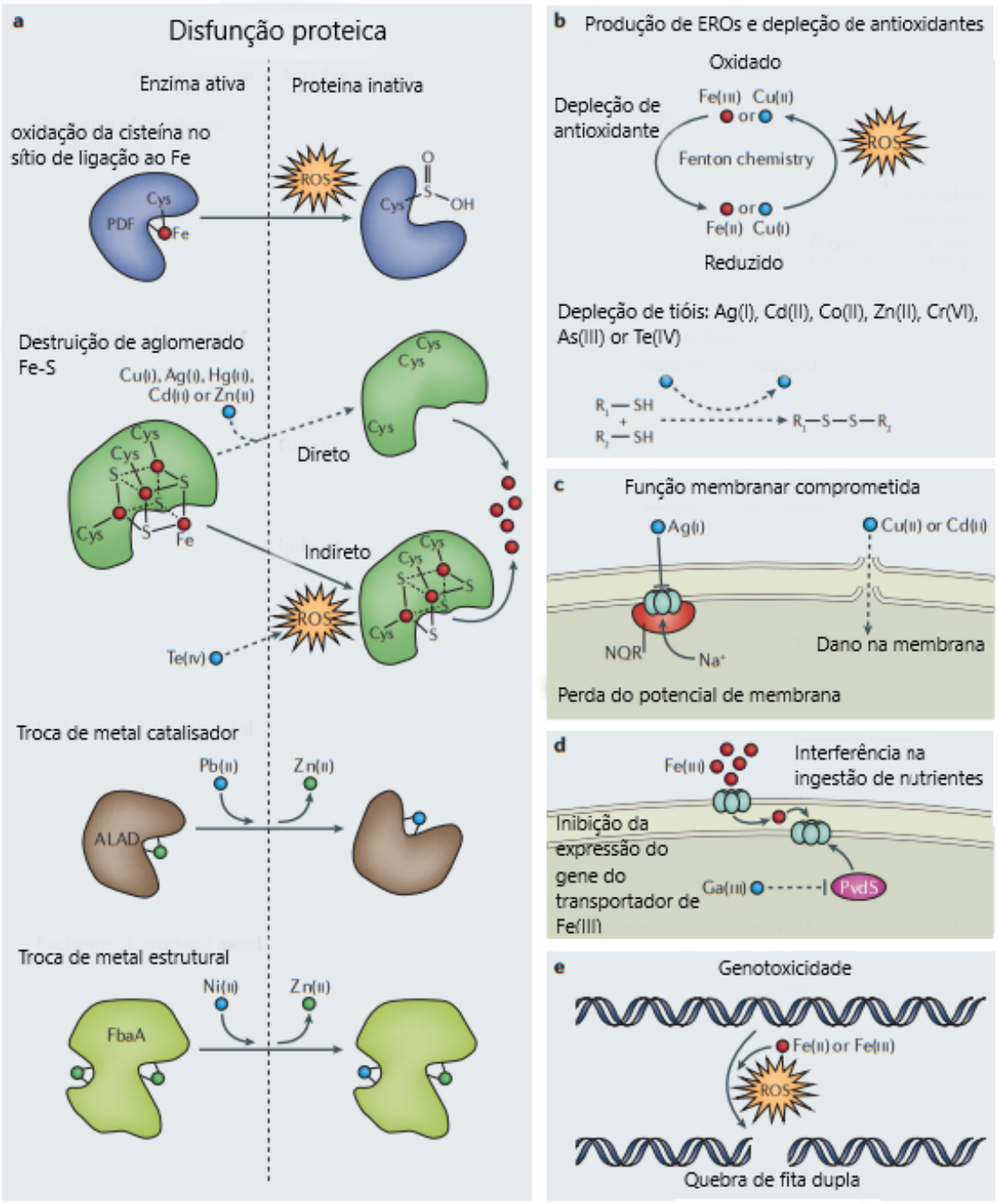
Os metais têm sido utilizados pelas suas propriedades antimicrobianas durante milhares de anos. Um dos primeiros trabalhos escritos que documentam a atividade antimicrobiana dos metais, datado de 1500 a.C., descreve a utilização de um sal de cobre como adstringente por um antigo médico egípcio. Existem alguns mecanismos pelos quais os metais agem sobre as células microbianas, como indução de espécies reativas de oxigênio e esgotamento de antioxidantes, disfunção proteica e perda de atividade enzimática, genotoxicidade, e eles podem não ser exclusivos. Acredita-se que em algumas circunstâncias a inibição do crescimento e a morte celular são provavelmente o resultado de uma combinação de diferentes mecanismos (Figura 6) (LEMIRE *et al*., 2013).

Metais participam de diversas funções biológicas e bioquímicas no corpo humano e sua deficiência no organismo pode gerar complicações, mas estudos apontam que parâmetros como dose, via de exposição, espécies químicas, bem como idade, sexo e genética são fatores que influenciam na toxicidade dos mesmos. Metais como arsênio, cádmio e cromo são classificados como agentes cancerígenos do Grupo 1 pelo Centro Internacional de Investigação do Câncer, sendo comprovadamente genotóxicos e carcinogênicos (ZHU, COSTA, 2020; TCHOUNWOU *et al.*, 2012). Por isso, embora apresentem os efeitos desejados sobre as células microbianas, deve-se ter cautela na sua exposição a células de mamíferos.

Conforme a demanda por medicamentos cresce, o campo de avaliação de segurança se torna cada vez mais importante para orientar a implementação de alternativas terapêuticas mais seguras e menos tóxicas. Para isso, as diretrizes de testes toxicológicos recomendados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) são uma ferramenta fundamental para avaliar os riscos potenciais dos produtos químicos à saúde humana e ao meio ambiente, utilizando métodos internacionalmente padronizados para atender às necessidades

regulatórias para aprovação de novos fármacos, investigando propriedades como citotoxicidade e mutagenicidade (OCDE, 2020).

Figura 6 — Mecanismos de toxicidade dos metais.



Legenda: ALAD, ácido δ-aminolevulínico desidratase; FbaA, frutose-1,6-bifosfato aldolase; NQR, NADH: quinona oxidoredutase; PDF, peptídeo deformilase; PvdS, um fator σ (σ24) de Pseudomonas aeruginosa. Fonte: Adaptado de LEMIRE *et al*., 2013.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Avaliar, através de modelos *in vitro*, a mutagenicidade e a citotoxicidade de complexos metálicos de compostos azólicos, com potencial aplicação no controle da infecção por *Sporothrix* spp., visando à identificação de alternativas terapêuticas de maior seletividade no tratamento da esporotricose.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a mutagenicidade *in vitro* dos compostos sobre cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, na presença e ausência de ativação metabólica exógena;
2. Analisar o perfil de citotoxicidade *in vitro* dos compostos sobre células de hepatocarcinoma humano HepG2 e fibroblastos embrionários de camundongo BALB/3T3 clone A31.

2 DESENVOLVIMENTO

1.1. METODOLOGIA

2.1.1. Compostos

Os complexos metálicos de azóis avaliados (MNJA-77 e MN-R10V2) foram sintetizados, caracterizados e fornecidos pelos grupos da Drª Sônia Rozental (Laboratório de Biologia Celular de Fungos, UFRJ) e Drª Maribel Navarro (Laboratório de Química Bioinorgânica e Catálise, UFJF). A estrutura e composição dos complexos está protegida, em razão do processo de pedido de patente.

2.1.2. Ensaio de mutagenicidade

O teste de Ames (*Salmonella*/microssoma) emprega cepas geneticamente modificadas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium que são incapazes de produzir histidina naturalmente devido a mutações em um *locus* específico responsável pela biossíntese deste aminoácido (MARON; AMES, 1983). Uma vez que a histidina é essencial para a sobrevivência celular e formação de colônias, a sua produção ineficiente impede que as cepas formem colônias visíveis em meio de cultura contendo traços de histidina (meio mínimo). Portanto, se o crescimento em um meio mínimo for observado após exposição ao mutágeno, a sua capacidade funcional de sintetizar o aminoácido foi restaurada, isto é, a mutação foi revertida (*His*$^{+}$) (AIUB, FELZENSZWALB, 2011).

O método de pré-incubação foi realizado para analisar o potencial dos compostos para induzir mutações genéticas nas cepas TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA1535. Esse método é uma variação do método tradicional de incorporação em meio sólido e consiste na exposição das cepas ao toxicante e ao tampão ou metabolizador exógeno, quando o experimento for realizado na presença do S9 *mix*, por um curto período de tempo (20 minutos) antes do plaqueamento. S9 *mix* é preparado a partir de um homogenato de fígados de ratos Sprague-Dawley induzidos a expressar mais enzimas de metabolização através de pré-tratamento com bifenil-policlorinato (Aroclor 1254) (MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

Estas cepas foram escolhidas seguindo as recomendações da diretriz 471 da OCDE que recomenda o uso de pelo menos cinco cepas, devendo quatro delas serem TA1535; TA1537 ou TA97a ou TA97; TA98; e TA100, cepas confiáveis e

reprodutivamente responsivas entre laboratórios. A cepa TA102 deve ser incluída para detectar mutações de *cross-linking*, logo, essas foram as cinco cepas utilizadas nesse trabalho (Quadro 1) (OCDE, 2020). A TA102 também deve ser incluída nos testes quando se tem indícios de que a substância analisada seja capaz de causar dano oxidativo no DNA, visto que em seu plasmídeo pAQ1 foi inserida a mutação *hisG428*, que é revertida por mutágenos que causam danos oxidativos. Além disso, a mutação *hisG428* confere maior sensibilidade à linhagem através da amplificação do número de sítios-alvos (MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

Quadro 1 — Características genotípicas das cepas.

Cepa	Mutação em *his*	Plasmídeos	Outras mutações	Tipo de mutação detectável	
TA97a	*hisD6610 hisO1242*	pKM101	*rfa* Δ *(uvrB chl bio)*	*Frameshift*	Adição de par G:C
TA98	*hisD3052*	pKM101	*rfa* Δ *(uvrB chl bio)*	*Frameshift*	Deleção de par G:C
TA100	*hisG46*	pKM101	*rfa* Δ *(uvrB chl bio)*	Substituição	G:C para A:T
TA102	*hisG428*	pKM101 pAQ1	*rfa*	Substituição	A:T para G:C
TA1535	*hisG46*	-	*rfa* Δ *(uvrB chl bio)*	Substituição	G:C para A:T

Legenda: *rfa*: Mutação que altera a permeabilidade da parede celular bacteriana, permitindo a passagem de composto químico com estruturas maiores. Δ *(uvrB chl bio):* Deleção (Δ) do gene *uvrB* torna as linhagens sensíveis a radiação UV, além de torna-las auxotróficas para biotina. Fonte: Adaptado de AIUB, FELZENSZWALB, 2011.

Os ensaios foram realizados na presença e ausência de sistema de ativação metabólica (S9 *mix*). As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, EUA) em concentrações de 5 µM-0,0005 µM, determinadas por seleção de dose (dados não mostrados). O DMSO foi utilizado como controle negativo. Os controles positivos na ausência de metabolização exógena foram: 4-nitroquinolina-N-óxido (4NQO) (0,5 µg/placa) para TA97a e para TA98; azida sódica (AS) (5,0 µg/placa)

para TA100 e TA1535; mitomicina C (MMC) (0,5 µg/placa) para TA102. Os controles positivos na presença de S9 foram de 2-aminoantraceno (2-AA) (2,0 µg/placa) para o TA98, TA100 e TA1535; 2-aminoantraceno (2-AA) (5,0 µg/placa) para TA102 e TA97a.

Seguindo o método de pré-incubação, 500 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4, ou S9 mix (4%), 100 µL de amostra-teste e 100 µL da cepa (1-2 × 10^9 células/mL) foram adicionados no tubo de ensaio em triplicata. Em seguida, os tubos foram incubados durante 20 minutos num agitador orbital (150 rpm) a 37±1 °C. Depois desse processo, 2 mL de ágar de superfície (0,6% ágar, 0,6% NaCl, 0,05 mM L-histidina e D-biotina) foram adicionados a cada tubo e o conteúdo foi vertido em placas de meio mínimo (1. 5% de ágar, 10 g/L $MgSO_4.7H_2O$; 100 g/L $C_6H_8O_7.H_2O$; 500 g/L K_2HPO_4; 175 g/L $Na(NH_4)HPO_4.4H_2O$, 2% de glucose). Essas placas foram incubadas durante 72 horas a 37±1°C. As colônias revertentes (*His*+) foram visualmente contadas a fim de determinar o índice de mutagenicidade (IM), calculado como a razão entre a média de revertentes espontâneas e a média de revertentes induzidas. As amostras foram consideradas mutagênicas com IM ≥ 2 e $p > 0,05$ após análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnet. As médias de revertentes, desvio padrão e índice de mutagenicidade foram calculados pelo Microsoft Excel e as análises estatísticas foram conduzidas pelo programa *GraphpadPrism* versão 5.0.

2.1.3 Ensaios de citotoxicidade

O objetivo do ensaio *Water-Soluble Tetrazolium*-1 (WST-1, *Cell Proliferation Reagent*, Roche, 2021) é avaliar a presença de células viáveis após a exposição a uma substância para determinar se ela induz morte celular por disfunção mitocondrial, visto que a metabolização do sal de tetrazólio se dá através das desidrogenases mitocondriais, reduzindo o tetrazólio a formazan, um composto de cor laranja que pode ser analisado por espectrofotometria. Quanto maior for o número de células viáveis, mais formazan será formado e mais perceptível será a mudança de cor do meio.

O ensaio de Lactato Desidrogenase (*Cytotoxicity Detection Kit*, Roche, 2016) é um ensaio colorimétrico que procura avaliar o potencial citotóxico da substância a ser testada, detectando danos na membrana plasmática, utilizando dois reagentes. O primeiro é um catalisador, permitindo que a enzima LDH presente no meio reduza NAD^+ a NADH e H^+ através da oxidação do lactato a piruvato. O segundo é um corante (cloreto de iodotetrazólio, INT) que no meio se torna um aceptor de hidrogênio tanto do NADH quanto do H^+, gerando uma coloração avermelhada, que é quantificada por

espectrofotometria.

As células HepG2 (hepatocarcinoma humano), fornecidas pela Dra. Danielle Palma de Oliveira (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo), foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 1% de aminoácidos não essenciais, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, e 1500 mg/L de bicarbonato de sódio, 1,0 g/L de glucose, 90%; soro fetal bovino, 10%. Os fibroblastos de rato BALB/3T3 clone A31, adquiridos do Banco de células do Rio de Janeiro (#0047), foram cultivados em DMEM com 4 mM L-glutamina ajustada para conter 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e 4,5 g/L de glucose e suplementados com 5 mM 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanesulfônico (HEPES) e soro de bezerro bovino até uma concentração final de 10%. As culturas foram mantidas a 37 °C com 5% de CO_2 em estufa.

Numa placa de fundo plano de 96 poços, 100 µL de suspensão celular (densidade de 1×10^4 células/poço) foram adicionados a cada poço, e a placa foi incubada durante o pernoite. No dia seguinte, descartado o sobrenadante, os poços foram tratados com 6 concentrações (0,0005-50 µM/poço) de cada amostra em triplicata por 24, 48 e 72 horas. DMSO 1% foi utilizado como controle negativo e Triton X-100 5% como controle positivo.

Para o ensaio LDH, 50 µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa de 96 poços. Depois, 50 µL/poço da mistura reagente (catalisador e solução de corante) foi adicionado a cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente protegida da incidência de luz durante 10 min, imediatamente seguida pela adição de 5 µL/poço do reagente de parada. Após esse processo, a absorbância foi lida num espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

Para o ensaio WST, após remoção do meio restante, os poços foram lavados com 100 µL de tampão salino de fosfato 1X (PBS) e depois 100 µL de 2% WST foram adicionados a cada poço. Após 90 mi de incubação a 37°C protegida da incidência de luz, a absorbância foi lida num espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade, calculada de acordo com o protocolo do *kit*.

$$Citotoxicidade\ (\%) = \frac{valor\ experimental - controle\ negativo}{controle\ positivo - controle\ negativo} * 100$$

As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas por ANOVA unidirecional e testes *post hoc* de Tukey ($p < 0,01$). A concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi calculada por ajuste de regressão não linear de curvas de dose-resposta (comportamento agonista). A porcentagem de citotoxicidade foi calculada pelo Microsoft Excel e as análises estatísticas foram conduzidas pelo programa *GraphpadPrism* versão 5.0.

2.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de Ames é de grande importância na avaliação do potencial genotóxico de substâncias devido a sua flexibilidade, visto que pode ser empregado para uma gama de substância – sintéticas, orgânicas, agentes físicos, agentes químicos –, além de um bom custo-eficácia, simplicidade e rapidez do método, procedimentos padronizados e reprodutíveis e a possibilidade de observar efeitos dose-dependentes (CLAXTON, UMBUZEIRO, DEMARINI, 2010). Através desse teste também podemos relacionar a mutagenicidade a uma potencial carcinogenicidade, dado que eventos danosos ao DNA de células somáticas ou germinativas estão ligados ao processo de carcinogênese, principalmente se estas mutações afetarem oncogenes e genes supressores de tumor, que têm papel fundamental no controle do ciclo celular, tanto na mitose e meiose (MCCANN *et al*., 1975; SALVADORI *et al.,* 2021; VARSOMICS, 2021).

O método de pré-incubação consiste na exposição das cepas ao toxicante e ao tampão ou metabolizador exógeno, quando o experimento for realizado na presença de S9 *mix*, por um curto período de tempo antes do plaqueamento. Esse período de pré-incubação por 20 minutos se dá para aumentar as chances de que metabólitos de meia-vida curta do toxicante interajam com as células das cepas bacterianas, já que o volume de amostra utilizado nesse método é menor, quando comparado ao volume utilizado do método de incorporação em placa (MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

De acordo com os resultados das avaliações de mutagenicidade (Tabela 1), não foi observada qualquer concentração mutagênica para nenhuma das cepas recomendadas pela OCDE para ambos os compostos, com e sem ativação metabólica ($IM < 2$, $p > 0,05$ ANOVA unidirecional seguido do teste de Dunnet).

Na ausência de ativação metabólica, o composto MNJA-77 não induziu citotoxicidade em nenhuma das cepas testadas. Na presença de ativação metabólica,

não foi detectado IM > 2 em nenhuma concentração do composto MNJA-77, embora a citotoxicidade tenha sido observada nas três concentrações mais altas (0,05 - 5 µM) para a TA1535, nas duas concentrações mais altas (0,5 e 5 µM) para a TA97a e na concentração mais alta (5 µM) para a TA98 (Tabela 1).

O composto MN-R10V2 mostrou-se citotóxico na ausência de ativação metabólica apenas na concentração mais alta (5 µM) para a cepa TA97a. Na presença de ativação metabólica, é possível observar níveis de citotoxicidade na concentração mais alta (5 µM) da cepa TA100 e nas quatro concentrações mais altas (0,005 - 5 µM) da cepa TA97a. Embora os compostos mostrem eventos de citotoxicidade não dependentes de dose, ambos parecem ser seguros, nas concentrações mais baixas do ensaio, para eventos mutagênicos (Tabela 1).

A citotoxicidade de uma substância pode ser alterada na presença de sistemas de ativação metabólica (OCDE, 2020). Para ambos os complexos, a utilização do sistema de ativação metabólica aumentou a citotoxicidade sobre *S.* Typhimurium. Esse fenômeno também foi observado em outros trabalhos, como descrito por Wei e Li (2022), em um ensaio de citotoxicidade dependente do metabolismo, houve um aumento da citotoxicidade do cetoconazol mediada por $NADPH/NAD^{+}$, sugerindo ativação metabólica via oxidação de fase 1.

Tabela 1 — Valores médios ± DP (IM) das colônias revertentes de cepas de *Salmonella* Typhimurium após a exposição aos compostos.

Complexo	µM	-S9					+S9				
		TA1535	**TA97a**	**TA98**	**TA100**	**TA102**	**TA1535**	**TA97a**	**TA98**	**TA100**	**TA102**
MNJA-77	0	11 ± 3 (1,0)	209 ± 35 (1,0)	26 ± 3 (1,0)	137 ± 1 (1,0)	331 ± 35 (1,0)	22 ± 1 (1,0)	84 ± 7 (1,0)	24 ± 7 (1,0)	133 ± 10 (1,0)	449 ± 30 (1,0)
	0,0005	8 ± 1 (0,6)	127 ± 41 (0,6)[1]	30 ± 3 (1,2)	183 ± 5 (1,3)	205 ± 43 (0,6)[2]	16 ± 7 (0,7)	129 ± 10 (1,5)	18 ± 4 (0,8)	130 ± 17 (1,0)	409 ± 13 (0,9)
	0,005	7 ± 2 (0,7)	101 ± 22 (0,5)[2]	32 ± 9 (1,2)	141 ± 35 (1,0)	226 ± 47 (0,7)[2]	13 ± 1 (0,6)	93 ± 13 (1,1)	17 ± 1 (0,7)	131 ± 8 (1,0)	505 ± 7 (1,1)
	0,05	11 ± 1 (0,7)	96 ± 2 (0,5)[3]	32 ± 6 (1,2)	155 ± 18 (1,1)	225 ± 29 (0,7)[2]	**Citotóxico**	57 ± 50 (0,7)	16 ± 2 (0,7)	128 ± 2 (1,0)	517 ± 24 (1,2)
	0,5	11 ± 2 (0,9)	266 ± 7 (1,2)	46 ± 3 (1,8)	135 ± 14 (1,0)	360 ± 46 (1,1)[1]	**Citotóxico**	**Citotóxico[1]**	24 ± 4 (1,0)	158 ± 16 (1,2)	472 ± 12 (1,1)
	5	7 ± 1 (0,6)	246 ± 21 (1,2)	21 ± 1 (0,8)	158 ± 10 (1,2)	247 ± 33 (0,7)[2]	**Citotóxico**	**Citotóxico**	**Citotóxico[3]**	172 ± 18 (1,3)	527 ± 38 (1,2)
MN-R10V2	0	11 ± 3 (1,0)	209 ± 35 (1,0)	23 ± 6 (1,0)	137 ± 1 (1,0)	331 ± 35 (1,0)	22 ± 1 (1,0)	84 ± 7 (1,0)	24 ± 7 (1,0)	133 ± 10 (1,0)	449 ± 30 (1,0)
	0,0005	14 ± 4 (1,2)	143 ± 35 (0,7)	28 ± 11 (1,2)	183 ± 9 (1,3)[1]	255 ± 14 (0,8)	10 ± 2 (0,5)	97 ± 17 (1,2)	14 ± 3 (0,6)	116 ± 16 (0,9)	387 ± 21 (0,9)
	0,005	13 ± 4 (1,2)	132 ± 31 (0,6)	31 ± 2 (1,4)	134 ± 21 (1,0)	250 ± 42 (0,8)	11 ± 3 (0,5)	**Citotóxico**	15 ± 4 (0,6)	159 ± 10 (1,2)	433 ± 28 (1,0)
	0,05	13 ± 3 (1,2)	150 ± 21 (0,7)	38 ± 8 (1,7)	153 ± 24 (1,1)	250 ± 6 (0,8)	12 ± 1 (0,5)	**Citotóxico**	14 ± 6 (0,6)	111 ± 6 (0,8)	405 ± 24 (0,9)
	0,5	13 ± 2 (1,2)	297 ± 24 (1,4)	33 ± 1 (1,4)	154 ± 12 (1,1)	273 ± 42 (0,8)	13 ± 2 (0,6)	**Citotóxico**	15 ± 5 (0,6)	112 ± 25 (0,8)	434 ± 37 (1,0)
	5	13 ± 3 (1,2)	**Citotóxico[3]**	31 ± 6 (1,4)	177 ± 16 (1,3)[2]	223 ± 6 (0,7)	14 ± 5 (0,6)	**Citotóxico**	26 ± 4 (1,1)	**Citotóxico[3]**	424 ± 11 (0,9)

Legenda: DP: desvio padrão; IM: índice de mutagenicidade; -S9: ausência de ativação metabólica; +S9: presença de ativação metabólica. Controles positivos sem S9: 4NQO (0,5 µg/placa) para TA98 284 ± 17 revertentes e para TA97a 603 ± 13 revertentes; AS (5 µg/placa) para TA1535 493 ± 53 revertentes e TA100 721 ± 26 revertentes; MMC para TA102 1.436 ± 96 revertentes. Com S9: 2AA (2 µg/placa) para TA98 94 ± 4 revertentes, para TA1535 493 ± 63 revertentes e TA100 644 ± 74 revertentes; 2AA (5 µg/placa) para TA102 1.032 ± 57 revertentes e TA97a 103 ± 20 revertentes. 1 $p < 0,05$; 2 $p < 0,01$; 3 $p < 0,001$ versus controle negativo no teste ANOVA unidirecional e Dunnet post-hoc; n = 3 em triplicata. O negrito denota IF > 2. Fonte: A autora, 2023.

Além da possibilidade de citotoxicidade observada poder estar sendo induzida pela ativação metabólica da porção azólica do complexo, os metais também podem ter ação antibacteriana através de mecanismos que favorecem a morte celular, como indução de espécies reativas de oxigênio e esgotamento de antioxidantes, disfunção proteica e perda de atividade enzimática, genotoxicidade, levando a inibição do crescimento e morte celular por meio de mecanismos isolados ou uma combinação deles (LEMIRE *et al*., 2013).

Os antifúngicos azólicos têm ganhado destaque devido ao seu efeito inibitório sobre a enzima flavohemoglobina, através de um mecanismo semelhante ao observado contra o seu principal alvo fúngico, a C14-α-lanosterol demetilase. A flavohemoglobina converte o óxido nítrico em nitrato através da transferência de elétrons entre NADPH, FAD, grupamento heme e o oxigênio. Os azóis se ligam ao sítio catalítico do grupamento heme e essa interação interfere no mecanismo de defesa que a enzima desempenha no organismo bacteriano, não protegendo as bactérias do estresse nitrosativo (SARI *et al*., 2020).

Dito isso, pode-se sugerir que há uma limitação do teste de Ames para este estudo devido ao xenobiótico analisado, que apresenta comprovada atividade antimicrobiana em seus constituintes azólicos e metálicos. Essa limitação pode ser amenizada quando o ensaio for complementado com o resultado de outros testes, como preconizado no “Documento de orientação sobre as revisões das diretrizes de ensaios de toxicologia genética da OCDE”. Isso se faz necessário, pois para uma avaliação completa da capacidade de uma substância em causar dano ao DNA deve-se detectar mutações genéticas, danos cromossômicos e aneuploidia. Nenhum teste isolado consegue analisar todos estes *endpoints*, assim, esse documento cita alguns testes específicos que podem ser realizados para analisar cada um, como ensaio de micronúcleo e ensaio cometa (OCDE, 2015).

Quando células são expostas a xenobióticos, diversos tipos de danos podem ser causados a elas, e caso os danos sejam reparados parcialmente ou não sejam reparados, podem causar a proliferação de células defeituosas ou levar a algum mecanismo de morte celular (SALVADORI *et al.,* 2021). Um desses mecanismos é a apoptose, muito conhecido como um mecanismo programado, levando à autodestruição de células visando manter a integridade de um organismo. Nesse mecanismo, a célula passa por uma sequência de sinais, como enrugamento celular, degradação de proteínas, fragmentação nuclear e formação de corpúsculos

apoptóticos, que vão sinalizar a células fagocíticas a necessidade de se englobar esse organismo e destruí-lo (SALVADORI *et al.,* 2021).

Métodos utilizados para observar esse tipo de dano são os ensaios de citotoxicidade baseados na redução de sais de tetrazólio, como o WST, onde avalia-se a disfunção mitocondrial, ou seja, o nível de funcionalidade das células, já que sua estrutura ainda se encontra íntegra, mas o meio intracelular está sofrendo diversas alterações (ROCHE, 2021).

Outro tipo de morte celular é a necrose. Esse evento, diferentemente da apoptose, gera resposta inflamatória e dano tecidual, provocando perda da integridade e ruptura da membrana, levando a liberação do conteúdo intracelular para o meio extracelular (GAVA, ZAZONI, 2005). Para observar este evento, pode-se empregar o ensaio de LDH, visto que é uma enzima intracelular e quanto maior sua atividade no sobrenadante da cultura avaliada, maior a sugestão de dano de membrana celular.

No WST para BALB/3T3, o composto MNJA-77 apresentou resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$) na maior concentração, se aproximando de 100% de citotoxicidade nos tempos de 24 e 48 horas (CC_{50}: 24h – 22.97 µM; 48h – 22.64 µM), porém houve uma redução no tempo de 72 horas (CC_{50}: 72h – 115,1 µM). Já para o composto MN-R10V2 não foi observado esse comportamento. Todos os pontos se mostraram estatisticamente significativos na maior concentração, se aproximando dos 100% de citotoxicidade (CC_{50}: 24h – 17.96 µM; 48h – 16,24 µM; 72h – 18,2 µM) (Tabela 2 e Figura 7).

No ensaio de LDH, todas as concentrações de ambos os compostos inibiram significativamente as células BALB/3T3. Para o composto MNJA-77, todas as concentrações se aproximaram de 50% de citotoxicidade, porém, em 72h uma redução pode ser observada na maior concentração (CC_{50}: 24h – >50 µM; 48h – 0,003 µM; 72h – 0,0002 µM). Para MN-R10V2, em todos os tempos a maior concentração se aproximou de 100% de citotoxicidade (CC_{50}: 24h – 6,9 µM; 48h – 2,8 µM; 72h – 0,0008 µM) (Tabela 2 e Figura 8).

Na avaliação de citotoxicidade para BALB/3T3, não foi observado nenhum comportamento dose-dependente e, em ambos os ensaios, o composto MN-R10V2 se mostrou mais citotóxico quando comparado ao MNJA-77. A citotoxicidade foi mais observada nos ensaios de LDH, sugerindo dano por rompimento de membrana ou alteração de permeabilidade, mais relacionada à necrose. Tanto para os ensaios de

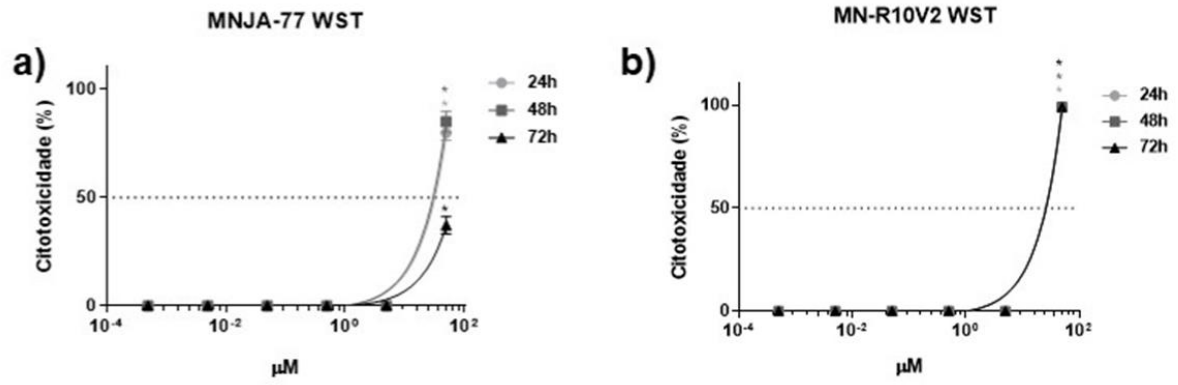
WST, quanto para o ensaio de LDH, uma possível explicação para o fenômeno de redução da CC_{50} no tempo de 72h pode ser a degradação ou esgotamento total dos complexos no meio, havendo então a proliferação das células sobreviventes e isso aparentar uma redução da citotoxicidade.

Tabela 2 — Concentração citotóxica dos compostos nos ensaios de WST e LDH em BALB/3T3.

	CC_{50} (µM)					
	24h		48h		72h	
	WST-1	LDH	WST-1	LDH	WST-1	LDH
MNJA-77	22.97	> 50	22.64	0.003	115.1	0.0002
MN-R10V2	17.96	6.9	16.24	2.8	18.2	0.0008

Legenda: CC_{50}: A concentração citotóxica para 50% da população celular foi calculada por ajuste de regressão não linear das curvas de dose-resposta (comportamento agonista). WST-1: tetrazólio solúvel em água. LDH: Desidrogenase Láctica. Fonte: A autora, 2023.

Figura 7 — Citotoxicidade dos compostos MNJA-77 e MN-R10V2 em células BALB/3T3 no ensaio de WST.

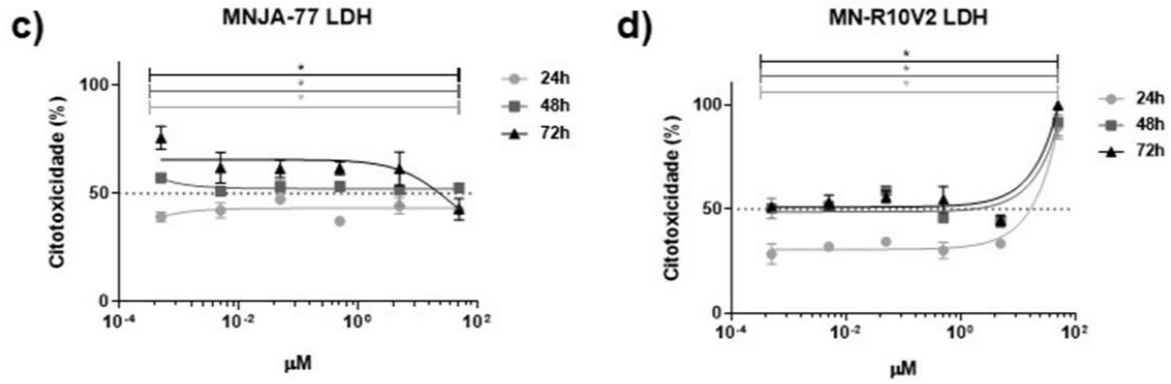


Fonte: A autora, 2023.

Borba-Santos *et al.* (2022) também utilizaram essa linhagem celular para analisados quatorze derivados da 1,4-naftoquinona contra *S. schenckii e S. brasiliensis* e o composto mais ativo, a naftoquinona 5 (um sal de prata de lausona), teve sua citotoxicidade avaliada em ensaios de WST e LDH. A lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) também conhecida como henna, um corante muito utilizado para pigmentar cabelos e pele, mas há muito tempo é utilizado pela medicina tradicional

para tratar infecções e outras patologias na pele (PRADHAN *et al*., 2012). Nesse estudo, podemos ver que a única diferença estrutural entre as naftoquinonas 3 (lausonato de prata) e 5 é a presença de um átomo de prata, mas essa simples alteração é capaz de potencializar os efeitos antifúngicos de forma significativa.

Figura 8 — Citotoxicidade dos compostos MNJA-77 e MN-R10V2 em células BALB/3T3 no ensaio de LDH.



Fonte: A autora, 2023.

Em 48h, o CC_{50} da naftoquinona 5 em BALB/3T3 para LDH foi de 11,13 µM e de 9,62 µM para WST (BORBA-SANTOS *et al*., 2022). Desta forma, é possível observar que metalodrogas com atividade antifúngica de diferentes classes químicas apresentam níveis variados de citotoxicidade e mecanismos de dano celular. Em termos de comparação, os complexos MNJA-77 e MN-R10V2 são mais citotóxicos do que a naftoquinona 5, em relação à danos de membrana, por outro lado são menos citotóxicos em relação à disfunção mitocondrial.

A linhagem celular BALB/3T3 foi escolhida para esses ensaios pois é uma linhagem de fibroblastos derivados de embriões de camundongos, pois são células encontradas na pele e importantes no processo de cicatrização, podendo então avaliar a atuação dos fármacos nas feridas causadas por traumas físicos, que são os mais comuns na transmissão dessa doença. Na histopatologia da doença, o *Sporothrix* provoca uma reação inflamatória nos tecidos afetados, gerando granulomas na derme e tecido subcutâneo que podem conter material caseoso, células epiteliais, fibroblastos, entre outras formas (RAMOS, 2018). Além disso, BALB/3T3 é

frequentemente utilizada em testes de citotoxicidade para estimar doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda recomendados pela OCDE pela sua maior reprodutibilidade em estudos interlaboratoriais (OCDE, 2010).

Por outro lado, uma limitação do uso de células BALB/3T3 seria a pouca ou nenhuma capacidade de metabolizar compostos xenobióticos. Além disso, se um toxicante atua em órgão específico *in vivo*, ele pode não produzir um efeito tóxico pelo mesmo mecanismo em células cultivadas derivadas de um tecido diferente do órgão-alvo (OCDE, 2010). Por isso, a linhagem HepG2, de hepatocarcinoma humano, também foi escolhida para esse estudo, visto que o fígado é o principal órgão metabolizador de fármacos, além de, como mencionado anteriormente, danos hepáticos poderem ser observados durante o uso de itraconazol, sendo relevante então avaliar o efeito dos complexos em uma linhagem hepática (EL-SHERSHABY *et al*., 2013, 2015; SOZEN *et al*., 2014).

Na avaliação de citotoxicidade em HepG2 não foi observado nenhum comportamento dose-dependente, e no ensaio WST, o composto MN-R10V2 se mostrou mais citotóxico. No WST, o composto MNJA-77 apresentou resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$) na maior concentração em todos os tempos, se aproximando de 50% de citotoxicidade nos tempos de 48 e 72 horas (CC_{50}: 48h – 43.97 µM; 72h – 20.95 µM). Já para o composto MN-R10V2, não foi observado esse comportamento. Nenhum dos pontos se mostrou estatisticamente significativos em nenhuma das concentrações, se aproximando dos 100% de citotoxicidade (CC_{50}: 24h – 9.15 µM; 48h – 6.4 µM; 72h – 0.16 µM) (Tabela 3 e Figura 9).

No ensaio de LDH para HepG2, nenhum dos pontos foi estatisticamente significativo para ambos os compostos. Para o composto MNJA-77 todas as concentrações no tempo de 24h não apresentaram citotoxicidade, porém a concentração mais alta de 48h se aproximou de 50% de citotoxicidade (CC_{50}: 24h - >50 µM; 48h – 36.76 µM; 72h – >50 µM). Para MN-R10V2, nos tempos de 24h e 48h, a maior concentração se aproximou de 50% de citotoxicidade, sendo observado comportamento contrário para o tempo de 72h, havendo uma redução explicada possivelmente por meio do mesmo fenômeno exemplificado para a linhagem BALB/3T3 (CC_{50}: 24h – >50 µM; 48h – >50 µM; 72h – >50 µM) (Tabela 3 e Figura 10).

Para a linhagem HepG2, metabolicamente competente, os complexos foram, de forma geral, menos citotóxicos do que para BALB/3T3. Isso pode estar ocorrendo, por que além de expressar enzimas que podem gerar metabólitos reativos que podem

induzir citotoxicidade, as enzimas também podem agir desintoxicando esses compostos e metabólitos, reduzindo sua toxicidade através do processo de biotransformação, que pode ser classificado em duas fases, fase I, por meio de reações de oxirredução, e fase II, por conjugação ou hidrólise (GU, MANAUTOU, 2012).

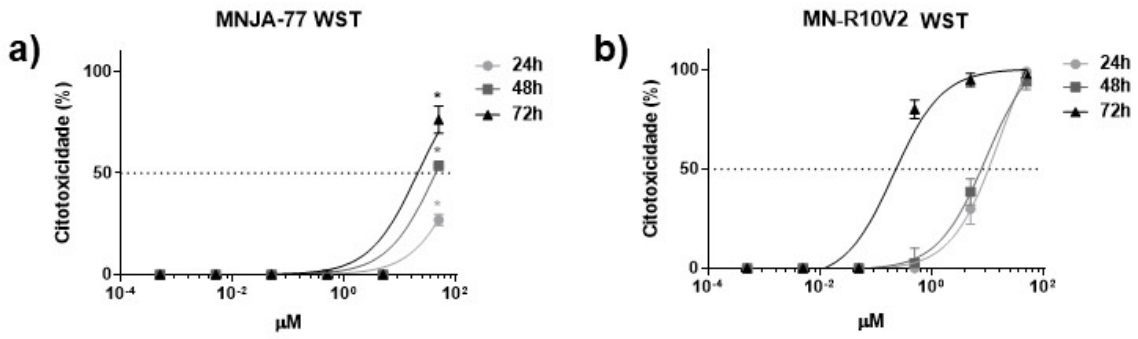
As metalotioneínas são um grupo de proteínas intracelulares de baixo peso molecular que estão envolvidas no acúmulo, transporte e propriedades biológicas de diversos metais essenciais para o organismo humano, como zinco, cobre, selênio, ou xenobióticos como cádmio, mercúrio, prata, arsênico, chumbo. Sua afinidade com essas moléculas se dá através do seu alto conteúdo de resíduos de cisteína, onde o grupamento tiol (R-SH) interage com os metais. A exposição a íons metálicos pode induzir a uma maior expressão dessas proteínas, podendo estar envolvidas em processos de desintoxicação por metais (MILES *et al*., 2014).

Tabela 3 — Concentração citotóxica dos compostos nos ensaios de WST e LDH para HepG2.

	CC_{50} (µM)					
	24h		48h		72h	
	WST-1	LDH	WST-1	LDH	WST-1	LDH
MNJA-77	> 50	> 50	43.97	36.76	20.95	> 50
MN-R10V2	9.15	> 50	6.4	> 50	0.16	> 50

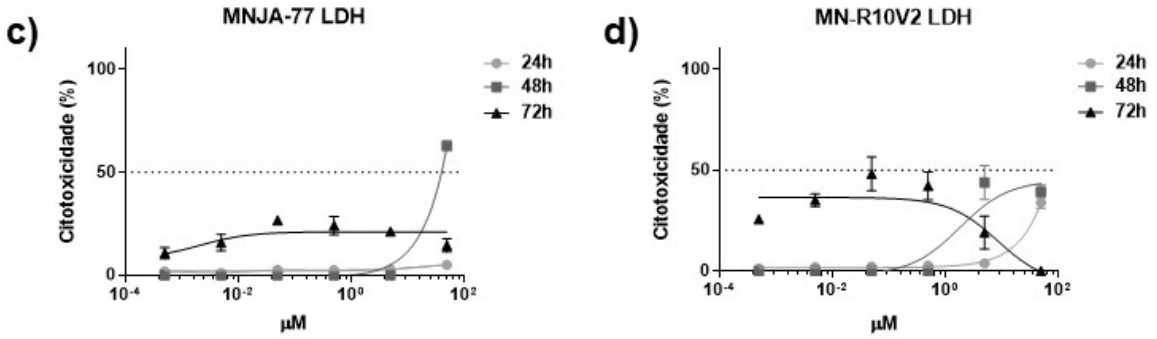
Legenda: CC_{50}: A concentração citotóxica para 50% da população celular foi calculada por ajuste de regressão não linear das curvas de dose-resposta (comportamento agonista). WST-1: tetrazólio solúvel em água. LDH: Desidrogenase Láctica. Fonte: A autora, 2023.

Figura 9 — Citotoxicidade dos compostos MNJA-77 e MN-R10V2 em células HepG2 no ensaio de WST.



Fonte: A autora, 2023.

Figura 10 — Citotoxicidade do composto MNJA-77 e MN-R10V2 em células HepG2 no ensaio de LDH.



Fonte: A autora, 2023.

No corpo humano, a quantidade produzida dessa proteína nos tecidos possui um baixo nível basal, podendo variar de acordo com a idade e tipo de tecido, sendo sintetizadas principalmente no fígado e nos rins, porém sua expressão aumentada já foi observada em alguns tipos de câncer de fígado, mama, cólon, rim, entre outros. Entretanto, quando analisada a expressão em carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma hepático, seus níveis se mostraram reduzidos (CHERIAN, JAYASURYA, BAY, 2003). Por isso, pode ser relevante investigar a toxicidade desses complexos em linhagens hepáticas não tumorais em investigações futuras.

Apesar das evidências de citotoxicidade dos complexos, em estudos conduzidos pelo grupo com outras metalodrogas, como a naftoquinona 5 (dados não divulgados), a citotoxicidade na cultura em monocamada é significativamente reduzida no modelo de cultura celular tridimensional (3D). Desta forma, a investigação da citotoxicidade dos complexos pode ser aprofundada pela utilização de modelos 3D de cultura celular, considerando limitações devido às discrepâncias biológicas entre as culturas em monocamada e o organismo vivo.

3 CONCLUSÃO

Os ensaios realizados com os complexos MNJA-77 e MN-R10V2 mostraram que não houve detecção de mutagenicidade em nenhuma das cepas avaliadas na presença e ausência de ativação metabólica, sendo este um achado relevante na investigação de segurança de novos fármacos. Também não foram observados comportamentos dose-dependentes para citotoxicidade em modelo bacteriano.

Em geral, o complexo MN-R10V2 se mostrou mais citotóxico, do que o complexo MNJA-77 nos ensaios de WST e LDH em modelo eucarionte. Eventos citotóxicos foram mais observados nos ensaios de LDH para ambos os complexos, sugerindo dano por rompimento de membrana ou alteração de permeabilidade, mais relacionada à necrose.

Ambos os complexos se mostraram menos citotóxicos para a linhagem HepG2, quando comparada à BALB/3T3, sugerindo a possibilidade de um mecanismo de desintoxicação, visto que essa linhagem é metabolicamente competente.

REFERÊNCIAS

AIUB, C. A. F., FELZENSZWALB, I. Os princípios do Teste de Ames (Salmonella/microsomo) e sua aplicabilidade. **Genética na Escola**, v. 6, n. 2, p. 11-16, 2011.

ALVAREZ, C. M.; OLIVEIRA, M. E.; PIRES, R. H. Sporotrichosis: A Review of a Neglected Disease in the Last 50 Years in Brazil. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2152, 2022.

AZEVEDO-FRANÇA, J. A. **Síntese e caracterização de complexos metálicos de zinco e cobre contendo ligantes azólicos: estudos de interação com DNA e avaliação de suas atividades antiparasitárias e antifúngicas.** 2019. 150 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.

AZEVEDO-FRANÇA, J. A. *et al*. Synthesis and biological activity of novel zinc-itraconazole complexes in protozoan parasites and Sporothrix spp.. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 5, p. 1–15, 2020.

AZEVEDO-FRANÇA, J. A. *et al.* Antifungal promising agents of zinc(II) and copper(II) derivatives based on azole drug. **Journal of Inorganic Biochemistry** 219:111401, 2021.

BORBA-SANTOS, L. P. *et al*. A novel naphthoquinone derivative shows selective antifungal activity against Sporothrix yeasts and biofilms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 749–758, 1 jun. 2022.

CABAÑES, F. J. Sporotrichosis in Brazil: Animals+ humans= one health. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p. 73-74, 2020.

CHERIAN, M. G.; JAYASURYA, A.; BAY, B.H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 533, n. 1-2, p. 201-209, 2003.

CLAXTON, L. D.; UMBUZEIRO, G. A.; DEMARINI, D. M. The Salmonella mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 11, p. 1515-1522, 2010.

EL-SHERSHABY, A. *et al*. *In utero* exposure to itraconazole during different gestational periods of rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 1, p. 50-59, 2014.

EL-SHERSHABY, A. *et al*. Biomonitoring of the genotoxic and hepatotoxic effects and oxidative stress potentials of itraconazole in pregnant rats. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 104, n. 2, p. 55-64, 2015.

EUROFARMA. **Itraconazol: Cápsula dura**. Responsável técnico Maria Benedita

Pereira. São Paulo - SP, 2018. Bula de remédio, 37p. Disponível em: https://cdn.eurofarma.com.br//wp-content/uploads/2018/01/itraconazol-bulaprofissional-saude-eurofarma.pdf. Acesso em: 25 nov. 2022.

FALCÃO, E. M. M. *et al*. Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, p. e00109218, 2019.

FIOCRUZ. **Doenças negligenciadas.** Disponível em: https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas. Acesso em: 10 abril 2023.

FREITAS, D. F. S. *et al.* Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3110, 2014.

GAGINI, T. *et al*. Metal–azole fungistatic drug complexes as anti-Sporothrix spp. agents. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 16, p. 13641-13650, 2018.

GAVA, A. A.; ZANONI, J. N. Envelhecimento celular. **Arq Ciênc Saúde Unipar**, v. 9, n. 1, p. 41-6, 2005.

GREMIÃO, I. D. F. *et. al.* Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil – Volume 26, Number 3 - March 2020 - **Emerging Infectious Diseases journal** - CDC. 2020.

GU, X.; MANAUTOU, E. J. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 14, p. e4, 2012.

KAUFFMAN, C. A. *et al*. Diretrizes de Prática Clínica para o Manejo da Esporotricose: Atualização de 2007 pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América. **Doenças Infecciosas Clínicas**, 45 (10), P. 1255–1265, 2007.

LARSSON, C. E. Sporotrichosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, p. 250-259, 2011.

LEMIRE, J. A. *et. al.* Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 371-384, 2013.

LEPESHEVA, I. G.; *et al*. Sterol 14α-demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. **Chemistry & biology**, v. 14, p. 1283-1293, 2007.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, p. 173–215, mar. 1983.

MCCANN, J. *et al*. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 12, p. 5135-5139, 1975.

MELLO, F. V. C. *et al*. Novel nitroimidazole derivatives evaluated for their trypanocidal, cytotoxic, and genotoxic activities**. European Journal of Medicinal Chemistry**, v.186, p. 111887, 2020.

MILES, A. T. *et al*. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 35-70, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde de A à Z: Esporotricose humana**, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/e/esporotricose-humana. Acesso em: 25 nov. 2022.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.

NAVARRO, M. *et al*. Metallodrugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Recent advances and new insights. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 15, p. 1763-1789, 2021.

OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico). **Guidance Document on "Using Cytotoxicity Tests To Estimate Starting Doses For Acute Oral Systemic Toxicity Tests.** Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/OCDE/OCDE-gd129.pdf. Acesso em: 22 maio 2023.

OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico). Guidance document on revisions to OCDE genetic toxicology test guidelines. **OCDE Workgroup of National Coordinators for Test 42 Guidelines (WNT)**. 2015. Disponível em: https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Draft%20Guidance%20Document%20on%20OECD%20Genetic%20Toxicology%20Test%20Guidelines.pdf. Acesso em: 22 maio 2023.

OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico). **Guidelines for the Testing of Chemicals: Bacterial Reverse Mutation Test**, vol. 471, 2020. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en. Acesso em: 03 out. 2022.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). **Primeira reunião global da OMS sobre DTNs da pele pede maiores esforços para lidar com seu fardo.** 2023. Disponível em: https://www.who.int/news/item/31-03-2023-who-first-global-meeting-on-skin-ntds-calls-for-greater-efforts-to-address-their-burden. Acesso em: 22 maio 2023.

OPAS (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE). **Doenças tropicais negligenciadas: OPAS pede fim dos atrasos no tratamento nas Américas.** Disponível em: https://www.paho.org/pt/noticias/28-1-2022-doencas-tropicais-negligenciadas-opas-pede-fim-dos-atrasos-no-tratamento-nas| Organização Pan-Americana da Saúde (paho.org). Acesso em: 10 abril 2023.

PRADHAN, R. *et al*. From body art to anticancer activities: perspectives on medicinal properties of henna. **Current drug targets**, v. 13, n. 14, p. 1777-1798, 2012.

PUBCHEM. **Itraconazol**. Disponível em:

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Itraconazole. Acesso em: 29 maio 2023.

RABELLO, V. B. S. *et al*. The historical burden of sporotrichosis in Brazil: a systematic review of cases reported from 1907 to 2020. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 231-244, 2022.

RAMOS, V. *et al*. **Esporotricose óssea: casuística histórica de um centro de referência em uma região hiperendêmica**. 2018. Tese de Doutorado.

ROCHE. **Cell Proliferation Reagent WST-1**. 2021. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/350/519/cellprorobul.pdf. Acesso em: 03 out. 2022.

ROCHE. **Cytotoxicity Detection Kit (LDH)**. 2016. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/215/534/11644793001bul.pdf. Acesso em: 03 out. 2022.

RODRIGUES, A. M. *et al*. The threat of emerging and re-emerging pathogenic Sporothrix species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 813–842, 2020.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Current progress on epidemiology, diagnosis, and treatment of sporotrichosis and their future trends. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 776, 2022.

SALVADORI, D. M. F. *et al.* **Da toxicogenética à toxicogenômica**. São Paulo, Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2021.

SARI, S. *et al*. Derivados azólicos antibacterianos: atividade antibacteriana, citotoxicidade e estudos mecanísticos in silico. **Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos**, v. 81, n. 8, p. 1026-1036, 2020.

SCHUBACH, T. M. *et al*. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 10, p. 1623-1629, 2004.

SHARMA, B.; SHARMA, A. K.; SHARMA, U. Sporotrichosis: A Comprehensive Review on Recent Drug-Based Therapeutics and Management. **Current Dermatology Reports**, v. 11, n. 2, p. 110–119, 1 jun. 2022.

SOZEN, H. *et al*. Evaluation of the protective effect of silibinin in rats with liver damage caused by itraconazole. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 71, p. 1215-1223, 2015.

TCHOUNWOU, P. B. *et al*. Heavy metal toxicity and the environment. **Molecular, clinical and environmental toxicology: volume 3: environmental toxicology**, p. 133-164, 2012.

VARSOMICS. **Biologia geral do câncer**. Gilson Azevedo, 2021. Disponível em: https://blog.varsomics.com/biologia-geral-do-cancer/. Acesso em: 29 maio 2023.

WALLER, S. B. *et al*. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology** 52, p. 73–80, 2021.

WEI, H.; LI, P. A. Permeabilized Cryopreserved Human Hepatocytes as an Exogenous Metabolic System in a Novel Metabolism-Dependent Cytotoxicity Assay for the Evaluation of Metabolic Activation and Detoxification of Drugs Associated with Drug-Induced Liver Injuries: Results with Acetaminophen, Amiodarone, Cyclophosphamide, Ketoconazole, Nefazodone, and Troglitazone. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 50, n. 2, p. 140-149, 2022.

ZHU, Y.; COSTA, M. Metals and molecular carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 41, n. 9, p. 1161-1172, 2020.