



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Francisco do Vale Chaves e Mello

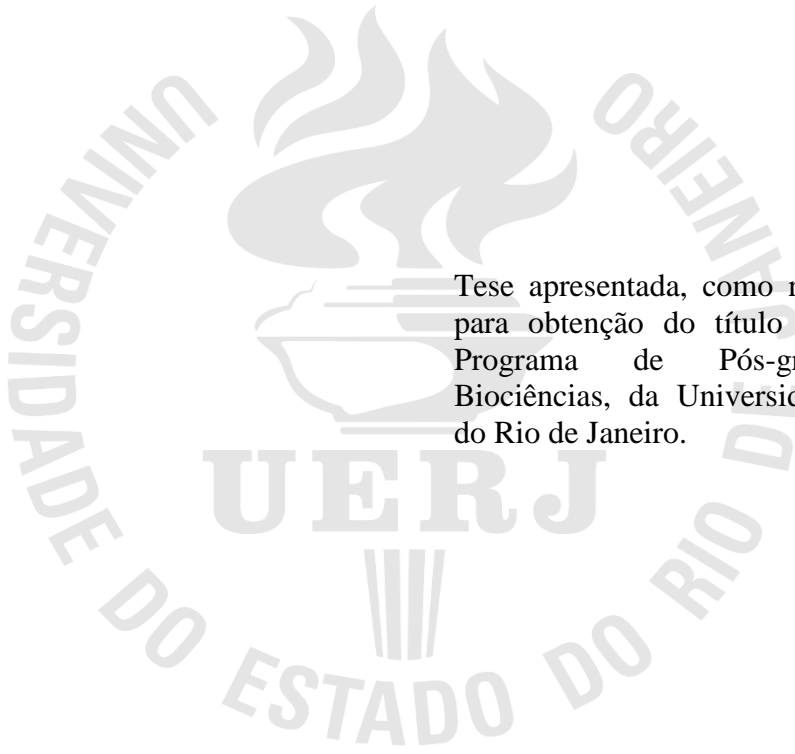
**Atividade tripanocida, citotóxica e genotóxica de novos derivados nitro-
heterocíclicos e os efeitos na expressão de genes do citocromo P450**

Rio de Janeiro

2017

Francisco do Vale Chaves e Mello

Atividade tripanocida, citotóxica e genotóxica de novos derivados nitro-heterocíclicos e os efeitos na expressão de genes do citocromo P450



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, no Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador : Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

M527 Mello, Francisco do Vale Chaves e.

Atividade tripanocida, citotóxica e genotóxica de novos derivados nitro-heterocíclico e os efeitos na expressão de genes do citocromo P450 / Francisco do Vale Chaves e Mello. – 2017.
168 f.

Orientadora: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb.

Tese (Doutorado em Biociências) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Chagas, Doença de – Teses. 2. Agentes antineoplásicos – Teses. 3. Genotoxicidade. 4. Citotoxina. 5. Agentes tripanocidas. I. Felzenszwalb, Israel. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.1/.9

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Francisco do Vale Chaves e Mello

Atividade tripanocida, citotóxica e genotóxica de novos derivados nitro-heterocíclicos e os efeitos na expressão de genes do citocromo P450

Tese a ser apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, no Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de julho de 2017.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb (orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Prof.^a. Dr.^a. Marcia Cristina Paes
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Alvaro Augusto da Costa Leitão
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Alcione Silva de Carvalho
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Aos professores e orientadores do Programa de Pós-graduação em Biociências, tão essenciais à formação acadêmica, profissional e pessoal dos alunos.

Aos colegas e alunos do Laboratório de Mutagênese Ambiental, que me acompanharam nesses últimos dez anos de estudo, trabalho e diversão.

Aos colaboradores do Instituto de Síntese Orgânica (Farmanguinhos/FIOCRUZ); do Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular (Departamento de Farmacologia e Psicobiologia/UERJ), e em especial ao Laboratório de Interação de Tripanossomatídeos e Vetores (Departamento de Bioquímica/UERJ), pela incrível contribuição a essa tese.

Aos demais colegas do Laboratório de Rádio e Fotobiologia, do Laboratório de Biologia do Câncer e do Laboratório de Biofotônica (Departamento de Biofísica e Biometria/UERJ), sempre disponíveis a fornecer ajuda.

À vida, principalmente dos animais de experimentação que tanto contribuem à ciência: devemos sempre respeitá-los e tratá-los com muito carinho.

Aos servidores, técnicos e terceirizados da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

E aos familiares e amigos que me acompanharam e apoiaram até esse momento.

Obrigado a todos. É imensurável a importância de todos nessa caminhada.

A ciência é o que importa;
Os cientistas, nem um pouco.

Steve Jones

RESUMO

MELLO, Francisco do Vale Chaves e. *Atividade tripanocida, citotóxica e genotóxica de novos derivados nitro-heterocíclico e os efeitos na expressão de genes do citocromo P450*. 2017. 168 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A doença de Chagas é uma doença tropical, infecciosa e negligenciada que atinge principalmente regiões pobres de países em desenvolvimento, infectando milhares de pessoas todo ano. A ausência de um tratamento farmacológico eficaz e seguro contribui para a manutenção da doença. O Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos), Fundação Oswaldo Cruz, sintetizou novas substâncias bioativas a fim de desenvolver uma alternativa segura e eficaz ao tratamento disponível. São eles: PNING 43-14 (etil-1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato), PNING 47-13 (4-ciclopropil-1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol) e PNING 39-14 (1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-4-(4-pentilfenil)-1*H*-1,2,3-triazol). O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade tripanocida, citotóxica e genotóxica de novos derivados nitro-heterocíclicos, e os genes do citocromo P450 expressos, através do tratamento de modelos *in vitro* de cultura de células. Os derivados apresentaram atividade tripanocida no tratamento (a partir de 5,0 µg/mL) de cultura axênica de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, forma amastigota, e de cultura primária de macrófagos peritoneais de camundongo *Swiss Webster* infectadas com *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Na análise da viabilidade celular pelos testes colorimétricos WST-1 e LDH, os derivados PNING 43-14 e PNING 47-13 induziram danos nas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL) e tempo de exposição (48 h), no tratamento de cultura de hepatocarcinoma humano HepG2, somente. O derivado PNING 39-14 induziu danos em células de HepG2 e de macrófagos RAW 264,7, a partir de concentrações (5,0 a 100 µg/mL) e tempos de exposição (a partir de 3 h) menores, demonstrando ser mais citotóxico. Na análise da indução de morte celular, observada pela marcação por anexina V e iodeto de propídio, no tratamento (50 a 1000 µg/mL) de células RAW 264,7, o derivado PNING 43-14 induziu necrose, enquanto o derivado PNING 39-14 induziu apoptose. No teste *Salmonella*/microsoma, os derivados induziram mutações de substituição de pares de bases nas linhagens de *Salmonella enterica* (TA100 e TA102), e deleção de pares de bases (TA97), independente de metabolização exógena, nas maiores concentrações (500 e 1000 µg/mL). No tratamento de linhagens que superexpressam enzimas nitroredutases (YG1021) e acetiltransferases (YG1024), induziram morte celular, independente de metabolização exógena, principalmente no tratamento com PNING 43-14 (100 a 1000 µg/mL). Os derivados também induziram a formação de células micronucleadas no tratamento (50 a 1000 µg/mL; 3 a 24 h) de células HepG2 e RAW 264,7, no teste do micronúcleo. Na análise da expressão de genes do citocromo P450 em células HepG2, os derivados PNING 43-14 e PNING 47-13 induziram a expressão do gene 3A4 e a inibição dos genes 1A2, 2B6 e 2E1, enquanto o derivado PNING 39-14 induziu a expressão dos genes 1A2, 2B6 e 2E1, e a inibição do gene 3A4. A expressão dos genes induzidos pelo tratamento com o derivado PNING 39-14 está mais relacionada a geração de respostas citotóxicas e genotóxicas. Apesar dos resultados tóxicos positivos, existem concentrações menores e seguras que apresentam atividade tripanocida relevante.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Derivados nitro-heterocíclicos. Atividade tripanocida.

Estudo toxicológico. Genes do citocromo P450.

ABSTRACT

MELLO, Francisco do Vale Chaves e. *Trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activity of new nitro-heterocyclic derivatives and their effects on the cytochrome p450 genes expression*. 2017. 168 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Chagas' disease is a tropical, infectious and neglected disease that affects mostly poor regions of developing countries, infecting thousands of people every year. The lack of a safe and effective pharmacological treatment also contributes to the maintenance of the Chagas' disease. The Institute of Pharmaceutical Technology, Oswaldo Cruz Foundation, synthesized new bioactive substances in order to develop a safe and effective alternative to the available treatment. They are: PNING 43-14 (ethyl-1-(1-methyl-4-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate), PNING 47-13 (4-cyclopropyl-1-(1-methyl-4-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazole) and PNING 39-14 (1-(1-methyl-4-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)-4-(4-pentylphenyl)-1*H*-1,2,3-triazole). The aim of this study was to assess the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities of new nitro-heterocyclic derivatives, and the cytochrome P450 genes expressed, through the treatment of *in vitro* cell cultures models. The nitro-heterocyclic derivatives showed trypanocidal activity in the treatment (from 5.0 µg/mL) of axenic amastigote evolutive form of *Trypanosoma cruzi* Y strain cell culture, and in the treatment of peritoneal macrophages primary mice cells infected with *Trypanosoma cruzi*, Y strain cells. In the assessment of cell viability through the colorimetric tests WST-1 and LDH, the nitro-heterocyclic derivatives PNING 43-14 and PNING 47-14 induced damages on high concentrations (500 and 1000 µg/mL) and exposure time (48 h), in the treatment of the human hepatocarcinoma cells HepG2, only. The derivative PNING 39-14 induced damage in HepG2 and macrophage RAW 264.7 cells, using low concentrations (5.0 to 100 µg/mL) and exposure times (from 3 h), being the most cytotoxic derivative. In the cell death assessment, observed by the annexin V and propidium iodide binding, in the treatment (50 to 1000 µg/mL) of RAW 264.7 cells, the derivative PNING 43-14 induced necrosis, while the derivative PNING 39-14 induced apoptosis. In the *Salmonella*/microsome test, the derivatives induced pair bases substitutions mutations in the treatment of *Salmonella enterica* TA100 and TA102 strains, and deletions mutations in the TA97 strain, with and without exogenous metabolic activation. In the treatment of strains that overexpress nitroreductases (YG1021) and acetyltransferases (YG1024) enzymes, the derivatives induced cell death, with or without exogenous metabolic activation, mostly by the treatment with the derivative PNING 43-14 (100 to 1000 µg/mL). In addition, the derivatives induced (50 to 1000 µg/mL; 3 and 24 h) the micronuclei formation in HepG2 and RAW 264.7 cells, in the micronucleus test. In the assessment of cytochrome P450 gene expression in HepG2 cells, the derivatives PNING 43-14 and PNING 47-13 induced the 3A4 gene expression and inhibit the 1A2, 2B6 and 2E1 gene expression, while the derivative PNING 39-14 induced the 1A2, 2B6 and 2E1 gene expression and inhibit the 3A4 gene expression. The gene expression induced by the treatment using the derivative PNING 39-14 is related to cytotoxic and genotoxic positive responses. Despite the toxic positive results, there are lower concentrations of the derivatives that are safe and still hold an important trypanocidal activity.

Keywords: Chagas' disease. Nitro-heterocyclic derivatives. Trypanocidal activity. Toxicological study. Cytochrome P450 genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição geográfica aproximada das linhagens de <i>T. cruzi</i>	22
Figura 2 –	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> e suas formas evolutivas.....	23
Figura 3 –	Distribuição global de casos da doença de Chagas baseada nas estimativas oficiais 2006-2010.....	24
Figura 4 –	Fórmula estrutural do benzonidazol e do nifurtimox.....	34
Figura 5 –	Desafios na doença de Chagas: controle, diagnóstico, tratamento e gestão clínica.....	36
Figura 6 –	Redução por 1 ou 2 elétrons de compostos nitroaromáticos.....	43
Figura 7 –	Fórmula estrutural do megazol.....	45
Figura 8 –	Síntese do derivado PTAL 04-09.....	48
Figura 9 –	Síntese do derivado PNING 43-14.....	49
Figura 10 –	Síntese do derivado PNING 47-13.....	50
Figura 11 –	Síntese do derivado PNING 39-14.....	51
Figura 12 –	Tempo de desenvolvimento e quantidade de substâncias com potencial terapêutico que chegam ao mercado.....	53
Figura 13 –	Possíveis eventos biológicos relevantes na toxicidade química.....	63
Figura 14 –	Atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepa Y, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	89
Figura 15 –	Atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepa Y, expostos ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	90
Figura 16 –	Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	91
Figura 17 –	Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	92

Figura 18 – Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	93
Figura 19 – Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	94
Figura 20 – Análise da indução da apoptose e necrose em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	96
Figura 21 – Teste <i>Salmonella</i> /microsoma com linhagens de <i>S. enterica</i> TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	98
Figura 22 – Teste <i>Salmonella</i> /microsoma com linhagens de <i>S. enterica</i> YG1021 e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	100
Figura 23 – Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	101
Figura 24 – Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	102
Figura 25 – Expressão relativa de genes do citocromo P450 de cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.....	103
Figura 26 – Atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepa Y, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	104
Figura 27 – Atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepa Y, expostos ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	105
Figura 28 – Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	106

Figura 29 – Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	107
Figura 30 – Teste colorimétrico LDH em cultura de cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	108
Figura 31 – Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	109
Figura 32 – Análise da indução da apoptose e necrose em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	111
Figura 33 – Teste <i>Salmonella</i> /microsoma com linhagens de <i>S. enterica</i> TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	113
Figura 34 – Teste <i>Salmonella</i> /microsoma com linhagens de <i>S. enterica</i> YG1021 e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	115
Figura 35 – Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	116
Figura 36 – Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	117
Figura 37 – Expressão relativa de genes do citocromo P450 de cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.....	118
Figura 38 – Atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepa Y, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	119
Figura 39 – Atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepa Y, expostos ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	120

Figura 40 – Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de macrófagos RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	121
Figura 41 – Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	122
Figura 42 – Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	123
Figura 43 – Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	124
Figura 44 – Análise da indução da apoptose e necrose em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	126
Figura 45 – Teste <i>Salmonella</i> /microsossoma com linhagens de <i>S. enterica</i> TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	128
Figura 46 – Teste <i>Salmonella</i> /microsossoma com linhagens de <i>S. enterica</i> YG1021 e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	130
Figura 47 – Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	131
Figura 48 – Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	132
Figura 49 – Expressão relativa de genes do citocromo P450 de cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.....	133

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Fórmula estrutural, peso molecular e atividade tripanocida dos derivados nitro-heterocíclicos.....	68
Quadro 2 –	Relação das linhagens de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium utilizadas nos testes quantitativo de mutagenicidade e controle de citotoxicidade, e suas respectivas características genotípicas.....	80
Quadro 3 –	Sequência de <i>primers</i> utilizadas na análise da expressão relativa de genes do citocromo P450.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Equivalência entre a concentração inicial, massa final e massa molar inicial dos derivados nitro-heterocíclicos utilizada nos diversos experimentos.....	70
Tabela 2 –	Valores (revertente/ μg) de inclinação da curva (potência mutagênica) utilizando o modelo estatístico de Bernstein, do megalol e seus derivados no tratamento da linhagem de <i>Salmonella enterica</i> TA100.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2AA	2-amino-antraceno
4NQO	4-nitroquinolina- <i>N</i> -óxido
A	Adenina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Azida sódica
ATP	Trifosfato de adenosina
BNZ	Benzonidazol
C	Citosina
CYP	Genes do citocromo P450
CYP450	Enzimas do citocromo P450
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dicarbonato de dietila
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e flavina
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
G	Guanina
HIV	Vírus da síndrome da imunodeficiência humana
<i>His</i>	Aminoácido histidina
ICH	Conselho Internacional para Harmonização
I.M.	Índice de mutagenicidade
LB	Caldo lisogênico
LDH	Enzima lactato desidrogenase
MitC	Mitomicina-C
MS	Ministério da Saúde
MNNG	Metil nitro nitroso de guanidina

MTZ	Metronidazol
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAT	Enzimas <i>N</i> -acetiltransferases
NF	Nifurtimox
NU	Nações Unidas
OECD	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
opm	Orbitações por minuto
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídio
pH	Potencial hidrogeniônico
REN	Reparo por excisão de nucleotídeos
RNA	Ácido ribonucleico
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
SFB	Soro fetal bovino
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNP	Sistema nervoso periférico
T	Timina
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. infestans</i>	<i>Triatoma infestans</i>
WST-1	<i>Water soluble tetrazolium salt</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
1.1	Doença de Chagas	21
1.1.1	<u>Trypanosoma cruzi</u>	21
1.1.2	<u>Epidemiologia e etiologia</u>	24
1.1.3	<u>Os vetores triatomíneos e outros meios de transmissão</u>	27
1.1.4	<u>Manifestação clínica</u>	30
1.1.5	<u>Prognóstico</u>	32
1.1.6	<u>Tratamento da doença de Chagas</u>	33
1.2	Novas substâncias bioativas em desenvolvimento	37
1.2.1	<u>Metas de desenvolvimento</u>	37
1.2.2	<u>Novas substâncias bioativas para a doença de Chagas</u>	39
1.3	Desenvolvimento de novos nitro-heterocíclicos	41
1.3.1	<u>Nitroimidazois</u>	41
1.3.1.1	Megazol.....	44
1.3.2	<u>Nitrotriazois</u>	46
1.3.3	<u>Novos derivados nitro-heterocíclicos</u>	47
1.3.3.1	PNING 43-14.....	49
1.3.3.2	PNING 47-13.....	50
1.3.3.3	PNING 39-14.....	51
1.4	Estudos toxicológicos de novas substâncias bioativas	51
1.4.1	<u>Órgãos regulatórios e outras instituições</u>	51
1.4.2	<u>Avaliação citotóxica, mutagênica e genotóxica de novas substâncias</u>	52
1.4.2.1	Situação.....	52
1.4.2.2	Citotoxicidade.....	54
1.4.2.3	Genotoxicidade.....	57
1.4.3	<u>Genes do citocromo P450 no metabolismo de xenobióticos</u>	60
1.4.3.1	Biologia.....	60
1.4.3.2	Bioativação de xenobióticos.....	62
1.4.3.3	Interação medicamentosa.....	65

2	OBJETIVOS	67
2.1	Gerais	67
2.2	Específicos	67
3	MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1	Preparo e diluição dos derivados nitro-heterocíclicos	69
3.2	Análise da atividade tripanocida	71
3.2.1	<u>Obtenção de massa parasitária</u>	71
3.2.1.1	Infecção da cultura de células Vero.....	71
3.2.1.2	Amastigogênese e análise da viabilidade celular dos amastigotas axênicas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepa Y.....	71
3.2.2	<u>Análise da atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>, cepa Y</u>	73
3.3	Cultura de células de linhagens permanentes	74
3.4	Análise da viabilidade celular pelos testes colorimétricos em cultura de células de linhagens permanentes	74
3.4.1	<u>Princípio dos testes colorimétricos</u>	74
3.4.2	<u>Controle negativo e positivo</u>	75
3.4.3	<u>Teste colorimétrico WST-1 para quantificação da viabilidade celular</u>	75
3.4.4	<u>Teste colorimétrico LDH para quantificação da atividade citotóxica</u>	76
3.5	Análise da indução da apoptose e necrose por citometria de fluxo	77
3.5.1	<u>Controle negativo e positivo</u>	77
3.5.2	<u>Análise por citometria de fluxo</u>	77
3.6	Análise da mutagenicidade pelo teste <i>Salmonella</i>/microsoma (teste de Ames)	78
3.6.1	<u>Linhagens de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium</u>	78
3.6.2	<u>Controle negativo e positivo</u>	80
3.6.3	<u>Metabolização exógena S9 mix</u>	81
3.6.4	<u>Teste quantitativo de mutagenicidade e controle de citotoxicidade com pré-incubação</u>	81
3.7	Análise da genotoxicidade pelo teste do micronúcleo em cultura de células de linhagens permanentes	82
3.7.1	<u>Controle negativo e positivo</u>	82
3.7.2	<u>Teste do micronúcleo</u>	83

3.8	Análise da expressão relativa de genes do citocromo P450 pela reação em cadeia da polimerase	84
3.8.1	<u>Tratamento da cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2</u>	84
3.8.2	<u>Extração e quantificação de RNA total</u>	84
3.8.3	<u>Síntese de DNA complementar (cDNA)</u>	85
3.8.4	<u>Primers dos genes do citocromo P450</u>	86
3.8.5	<u>Quantificação da expressão relativa de genes do citocromo P450 por qPCR</u>	86
4	RESULTADOS	88
4.1	PNING 43-14	88
4.1.1	<u>Análise da atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de <i>Trypanosoma cruzi</i>, cepa Y</u>	88
4.1.2	<u>Análise da atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>, cepa Y</u>	89
4.1.3	<u>Análise da viabilidade celular pelo teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagens permanentes</u>	90
4.1.4	<u>Análise da atividade citotóxica pelo teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagens permanentes</u>	93
4.1.5	<u>Análise da indução da apoptose e necrose por citometria de fluxo</u>	95
4.1.6	<u>Análise da mutagenicidade pelo teste <i>Salmonella</i>/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102</u>	97
4.1.7	<u>Análise da mutagenicidade pelo teste <i>Salmonella</i>/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens YG1021 e YG1024</u>	99
4.1.8	<u>Análise da genotoxicidade pelo teste do micronúcleo em cultura de células de linhagens permanentes</u>	101
4.1.9	<u>Análise da expressão relativa de genes do citocromo P450 pela reação em cadeia da polimerase</u>	103
4.2	PNING 47-13	104
4.2.1	<u>Análise da atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de <i>Trypanosoma cruzi</i>, cepa Y</u>	104
4.2.2	<u>Análise da atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>, cepa Y</u>	105
4.2.3	<u>Análise da viabilidade celular pelo teste colorimétrico WST-1 em cultura de</u>	

	<u>células de linhagens permanentes.....</u>	106
4.2.4	<u>Análise da atividade citotóxica pelo teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagens permanentes.....</u>	108
4.2.5	<u>Análise da indução da apoptose e necrose por citometria de fluxo.....</u>	110
4.2.6	<u>Análise da mutagenicidade pelo teste <i>Salmonella</i>/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102.....</u>	112
4.2.7	<u>Análise da mutagenicidade pelo teste <i>Salmonella</i>/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens YG1021 e YG1024.....</u>	114
4.2.8	<u>Análise da genotoxicidade pelo teste do micronúcleo em cultura de células de linhagens permanentes.....</u>	116
4.2.9	<u>Análise da expressão relativa de genes do citocromo P450 pela reação em cadeia da polimerase.....</u>	118
4.3	PNING 39-14.....	119
4.3.1	<u>Análise da atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de <i>Trypanosoma cruzi</i>, cepa Y.....</u>	119
4.3.2	<u>Análise da atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>, cepa Y.....</u>	120
4.3.3	<u>Análise da viabilidade celular pelo teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagens permanentes.....</u>	121
4.3.4	<u>Análise da atividade citotóxica pelo teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagens permanentes.....</u>	123
4.3.5	<u>Análise da indução da apoptose e necrose por citometria de fluxo.....</u>	125
4.3.6	<u>Análise da mutagenicidade pelo teste <i>Salmonella</i>/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102.....</u>	127
4.3.7	<u>Análise da mutagenicidade pelo teste <i>Salmonella</i>/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens YG1021 e YG1024.....</u>	129
4.3.8	<u>Análise da genotoxicidade pelo teste do micronúcleo em cultura de células de linhagens permanentes.....</u>	131
4.3.9	<u>Análise da expressão relativa de genes do citocromo P450 pela reação em cadeia da polimerase.....</u>	133
5	DISCUSSÃO.....	134
	CONCLUSÃO.....	147
	REFERÊNCIAS.....	149

INTRODUÇÃO

As doenças tropicais infecciosas negligenciadas são um grupo de doenças que atingem principalmente as regiões pobres de países em desenvolvimento, mas que também podem incidir em regiões não endêmicas, de países desenvolvidos, e por isso, aumenta a atenção fornecida a essa problemática pelas comunidades científicas, organizações governamentais e não governamentais, contribuindo com o desenvolvimento de novas estratégias de contenção, prevenção e tratamento (WHO, 2010; DIAS et al., 2016).

Esse grupo de doenças pode se originar dos mais diversos agentes infecciosos como vírus (hepatite, ebola, febre amarela, dengue), bactérias (tuberculose, leptospirose, sífilis), protozoários (doença de Chagas, malária, leishmaniose), helmintos (esquistossomose, cisticercose, teníase), entre muitos outros (BEYER et al., 2007; DIAS; PRATA; CORREIA, 2008). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas são afetadas por pelo menos uma doença infecciosa, e outras milhões estão em risco de infecção (WHO, 2010).

A pobreza e as precárias condições sociais, a pressão econômica, o desequilíbrio ecológico decorrente do desmatamento de novas áreas de selva, a falta de investimento em saúde pública e pesquisa e, em determinados países, as guerras internas e outros conflitos são as principais causas pelas quais as doenças ainda incidem nos países (BEYER et al., 2007; SKOLNIK; AHMED, 2010). Além disso, a carência por um tratamento eficaz também é fator determinante para a manutenção das doenças infecciosas e negligenciadas. O resultado para a população afetada e para economia dos países é grave, pois seus indivíduos perdem a capacidade de produzir, concomitante a redução da qualidade e expectativa de vida (WHO, 2007, 2010).

Por isso, as organizações governamentais e não governamentais desenvolvem relatórios com estratégias sociais a fim de estimular países a adotarem medidas para combater a prevalência das doenças infecciosas. Dentre eles, o relatório *Objetivos de Desenvolvimento do Milênio* e o relatório *Transformando nosso mundo: a agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável*, das Nações Unidas, estabelecem medidas que já beneficiaram milhares de indivíduos, protegendo-os da dor, instabilidade e pobreza, através do tratamento farmacológico e das intervenções socioeconômicas das nações afetadas. No entanto, ainda há muito a ser feito para a resolução dos problemas sociais, como a pobreza (WHO, 2007, 2010; MOLYNEUX; MALECELA, 2011; NAÇÕES UNIDAS, 2015; DIAS et al., 2016).

Dentre as doenças infecciosas e negligenciadas, a doença de Chagas atinge principalmente países da América Latina, incluindo o Brasil, sendo responsável pela infecção de milhões de pessoas no mundo todo, e que estão carentes de um novo tratamento farmacológico eficaz e de estratégias de combate à proliferação da doença. Por isso, ela é uma doença importante e é alvo das metas dos relatórios das Nações Unidas (DIAS et al., 2016).

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Doença de Chagas

1.1.1 *Trypanosoma cruzi*

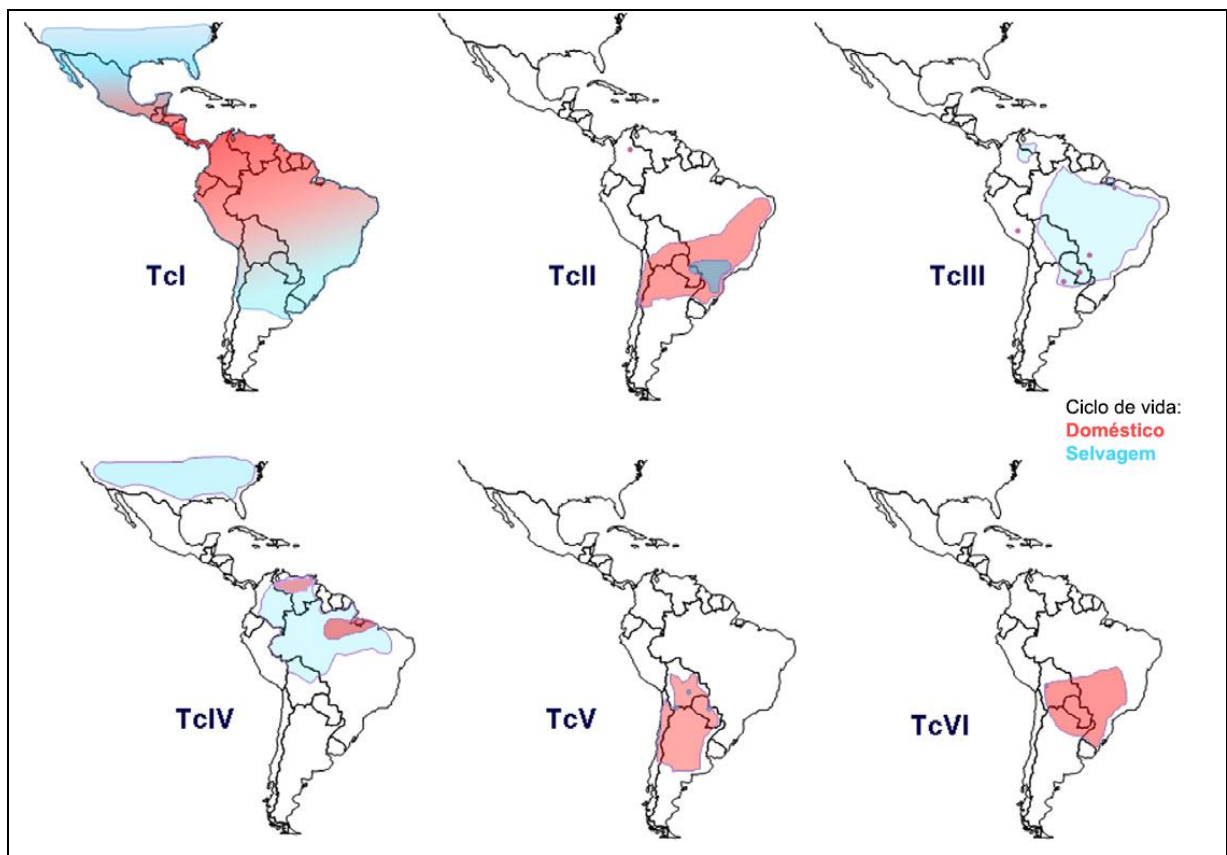
A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma doença tropical infecciosa e negligenciada causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, predominantemente transmitida ao homem por um grupo de insetos hematófagos da subfamília Triatominae, vetores da doença (CHAGAS, 1909; WHO, 2013; CORASSA et al., 2016). Descoberta por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909) e descrita, também, nos anos seguintes (CHAGAS, 1916a, 1916b; CHAGAS; VILLELA, 1922), tem grande prevalência e incidência nas populações de áreas rurais, pobres e de selva de todos os países da América Latina (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010), além de incidir em regiões não endêmicas de outros países através de meios específicos de transmissão (SCHMUNIS, 2007; SCHMUNIS; YADON, 2010; COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014).

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, espécie *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909; HOARE; WALLACE, 1966). Ele está presente na natureza há milhões de anos, em diferentes nichos ecológicos do ambiente silvestre, constituindo seu ciclo selvagem ao parasitar um grupo de mais de cem seres vivos selvagens, que formam seu reservatório natural, e domésticos (COURA; DIAS, 2009; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Graças à alta variabilidade genética do *T. cruzi*, existem diversas linhagens do protozoário com diversificadas características epidemiológicas e etiológicas (PRATA, 2001; HIGUERA; GUHL; RAMÍREZ, 2013). Na tentativa de melhorar o entendimento da biologia do parasita à luz dessas características, foi proposta uma divisão em seis grupos (*T. cruzi* I a VI) que se relaciona com distribuição geográfica, a via de infecção (vetor) e a manifestação clínica da doença. Desta forma, é possível empregar melhores estratégias de combate ao parasita e ao vetor, assim como desenvolver e oferecer um tratamento adequado à doença (ZINGALES et al., 2012; HIGUERA; GUHL; RAMÍREZ, 2013).

O grupo *T. cruzi* I tem maior prevalência em todo território das Américas, com exceção aos países do sul da América do Sul, e está mais associado à forma cardíaca da doença. Os demais grupos (*T. cruzi* II-VI) apresentam distribuição geográfica distintas (Figura 1). No Brasil, o grupo de maior prevalência é o *T. cruzi* II, que tem um ciclo de vida predominantemente doméstico e está associado a manifestações clínicas cardíacas, esofágicas e cólon do intestino (CARRANZA et al., 2009; ZINGALES, 2011; ZINGALES et al., 2012; HIGUERA; GUHL; RAMÍREZ, 2013).

Figura 1: Distribuição geográfica aproximada das linhagens de *T. cruzi*.

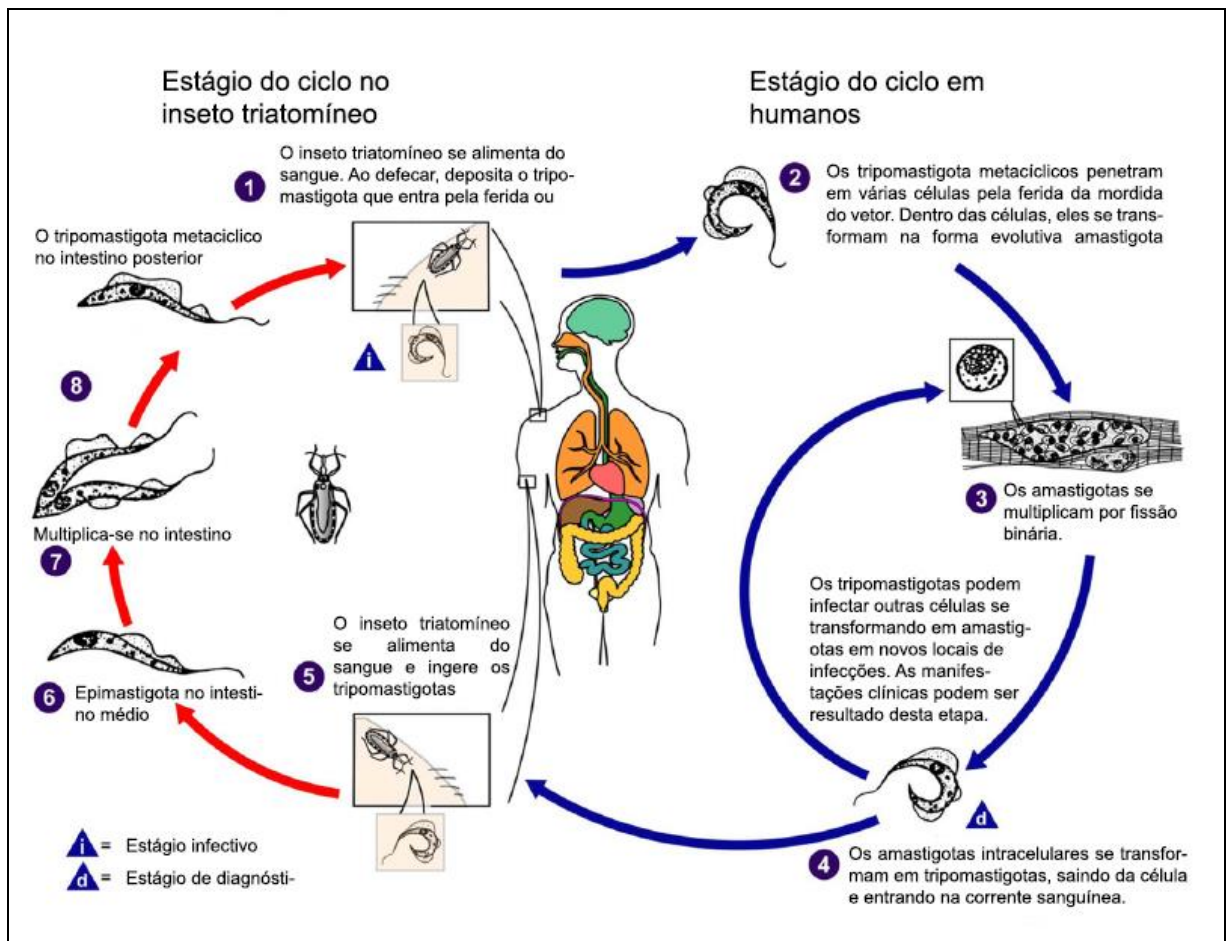


Fonte: adaptado de ZINGALES et al., 2012.

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Figura 2) começa e termina no sangue do reservatório animal contaminado, no ciclo selvagem e peridoméstico, ou do ser humano e outros animais domesticados, no ciclo doméstico. A principal forma evolutiva da população de *T. cruzi* presente na corrente sanguínea é a forma tripomastigota (90%). O inseto se infecta ao se alimentar desse sangue contaminado (ANDREWS et al., 1987; LEY et al., 1988; REY, 2001).

Na porção anterior do intestino médio do triatomíneo, o parasita se diferencia à forma epimastigota, fase evolutiva do protozoário altamente proliferativa, aumentando sua população. Na parede do canal posterior do intestino do inseto, o parasita se diferencia à forma tripomastigota metacíclica, infectiva, porém não replicativa. O *T. cruzi*, por fim, é excretado nas fezes do triatomíneo enquanto ele se alimenta (TYLER; ENGMAN, 2001; REY, 2001). O contato destas fezes contaminadas com o sangue é o meio mais importante de contágio da doença de Chagas em áreas de endemia. Esta via representa 70% dos casos de contaminação nos países onde não há programas de controle e combate ao vetor (COURA; DIAS, 2009).

Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e suas formas evolutivas.



Fonte: adaptado de CHATELAIN, 2015.

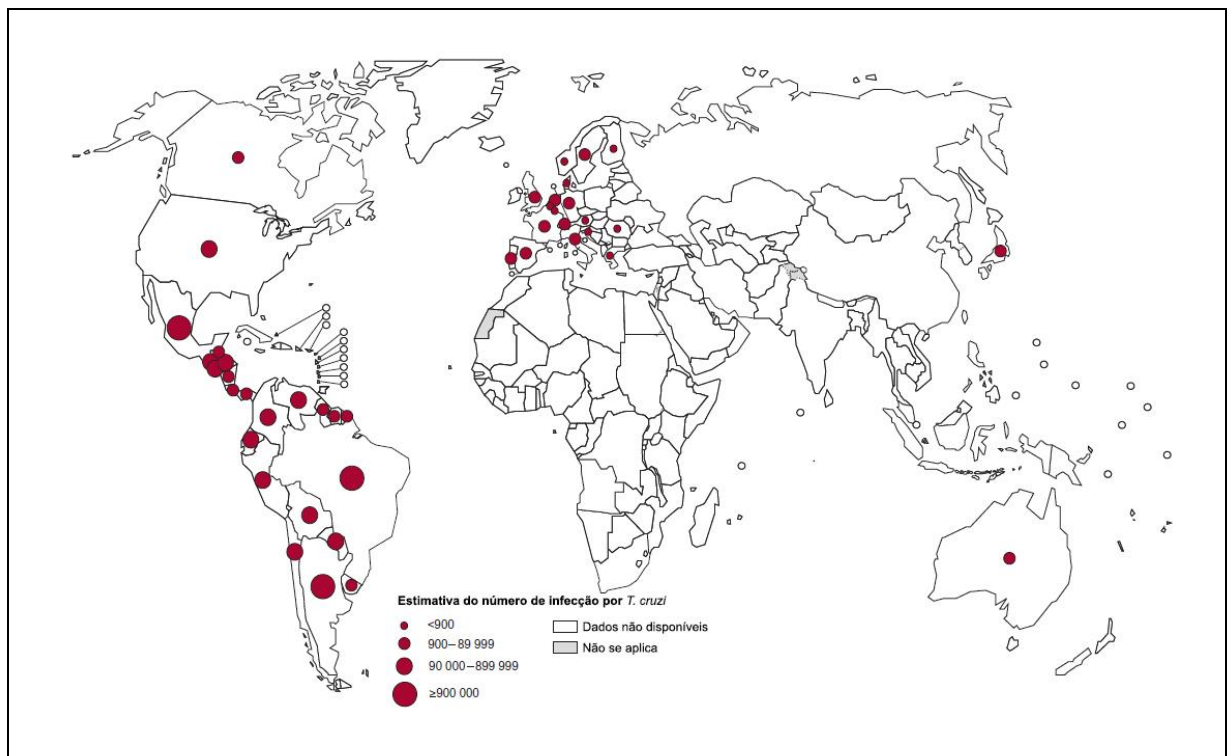
A forma evolutiva tripomastigota do *T. cruzi*, devido a sua alta mobilidade, é capaz de invadir tecidos e mucosas, parasitando inúmeras células nucleadas do hospedeiro mamífero. Tendo invadido as células, no citoplasma, o parasita se diferencia à forma evolutiva amastigota, que tem alto poder proliferativo, por fissão binária. Quando a população

dessa forma evolutiva intracelular aumenta, o protozoário se diferencia em tripomastigota novamente e pode seguir na corrente sanguínea ou na linfática a fim de parasitar outras células. Dessa forma, o triatomíneo pode recomeçar o ciclo ao se alimentar deste sangue contaminado (TYLER; ENGMAN, 2001; REY, 2001).

1.1.2 Epidemiologia e etiologia

Estima-se que aproximadamente 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, com grande parcela desse número proveniente de casos na América Latina (Figura 3) (WHO, 2013; DIAS et al., 2016). Além disso, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), 100 milhões de pessoas estariam em risco de infecção, com 56 mil novos casos e 12 mil mortes todo ano (ARMAGANIJAN; MORILLO, 2010; WHO, 2010).

Figura 3: Distribuição global de casos da doença de Chagas baseada nas estimativas oficiais 2006-2010.



Fonte: adaptado de WHO, 2013

Tendo em vista que a doença de Chagas atinge países e regiões muito heterogêneas, é importante entender as causas e consequências da infecção específica dessas localidades. Por isso, levando-se em consideração as características epidemiológicas da doença, é possível organizar os países afetados em grupos de acordo com: o ciclo de vida do parasito, seja ele selvagem, peridoméstico ou doméstico; os vetores envolvidos na transmissão da doença; a situação da infecção humana e do desenvolvimento da doença (manifestação clínica); e os controles empregados do vetor e de outros meios de transmissão (COURA; DIAS, 2009; COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014).

O grupo I, onde o Brasil, a Argentina, o Chile e o Uruguai estão inseridos, tem como características epidemiológicas a presença de todos os seres vivos necessários para o completo ciclo de vida do *T. cruzi*; o melhor controle do vetor e de outros meios de transmissão; e a predominante presença da fase crônica cardiomiopática da doença de Chagas (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014). Apesar do melhor controle dos meios transmissores da doença, principalmente no combate ao vetor, o Brasil ainda tem focos de transmissão e pessoas contaminadas em diversas localidades do país (DIAS et al., 2016). Estudos estimam que 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas pela doença de Chagas (MARTINS-MELO et al., 2014; WHO, 2015; DIAS et al., 2016) e 22 milhões estariam em risco de infecção (PAHO, 2006), com ocorrências em todas as partes do país, mas principalmente nas regiões norte e nordeste, onde o estado do Pará é o local de maior ocorrência (MARTINS-MELO et al., 2014; DIAS et al., 2016). Por outro lado, ao longo das últimas décadas, é possível observar uma diminuição na prevalência geral da doença na população. No entanto, o Brasil carece ainda de estudos que definam com mais exatidão a situação real da doença no país (MARTINS-MELO et al., 2014; DIAS et al., 2016).

Apesar de a América Latina ser o local de maior prevalência da doença de Chagas, existem pessoas contaminadas em diversos países não endêmicos ou que, por isso, começaram a apresentar novos focos de endemia, estabelecendo um risco de infecção real nessas localidades. Em regiões ao sul dos Estados Unidos (EUA), como no Arizona e na Califórnia, existem áreas endêmicas, ou em risco de se tornarem, devido à presença significativa de diversas espécies de vetores triatomíneos, além da existência de mamíferos infectados, reservatórios do parasita. Estudos confirmaram que 41% dos insetos coletados nessa região estavam infectados pelo *T. cruzi*, evidenciando que o risco de contaminação dessa população é real (SARKAR et al., 2010; PARKER; SETHI, 2011; MONTGOMERY et al., 2016).

No entanto, a migração legal e ilegal de indivíduos portadores do *T. cruzi* para países que tradicionalmente recebem imigrantes oriundos da América Latina, como os Estados Unidos e o Canadá, na América do Norte; a Espanha e Portugal, na Europa; o Japão, na Ásia; e a Austrália, na Oceania; regiões tradicionalmente não endêmicas e sem vetores, com exceções, é o motivo do surgimento de um novo problema de saúde pública, principalmente pela natural falta de preparado para diagnosticar a doença, dar assistência médica a pacientes e controlar os meios de transmissão da tripanossomíase americana (SCHMUNIS, 2007; COURA, DIAS, 2009; SCHUMUNIS; YADON, 2010; COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014). Por essas razões, estima-se que dentre os três milhões de imigrantes presentes na Europa, oriundos da América Latina, 120 mil estejam infectados pelo *T. cruzi*. Nos Estados Unidos, estima-se, também, que existam 340 mil indivíduos infectados dos sete milhões de imigrantes lá presentes (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014). Pelos motivos descritos, esses países estão inseridos no grupo V das características epidemiológicas da doença de Chagas (SCHMUNIS, 2007; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

A infecção pelo *T. cruzi* na natureza ocorre há milhões de anos. Evidências datam de nove mil anos atrás e foram encontradas em corpos mumificados (GUHL et al., 1999, AFDERHEIDE et al., 2004). Os vetores triatomíneos também são conhecidos desde o século XVI (LENT; WIGODZINSKY, 1979). No entanto, foi no século passado (XX), por motivos econômicos, sociais e ecológicos, que o homem se incluiu no ciclo epidemiológico da doença. A infecção evoluiu de uma zoonose entre os animais do ciclo selvagem para uma antropozoonose (COURA; DIAS, 2009).

Além disso, respondendo as pressões antropológicas no ciclo selvagem, o triatomíneo vetor se domiciliou ao encontrar um ambiente favorável nas vivendas rurais do homem interiorano (VINHAES; DIAS, 2000). Dentre as mais de 120 espécies, estima-se que de oito a dez sejam domiciliadas (PRATA, 2001; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). O aumento do desmatamento e, em consequência disto, a diminuição da quantidade de animais silvestres que constituem fonte alimentar para os triatomíneos, foram as razões para o início da expansão da doença (COURA; DIAS, 2009).

Além do desequilíbrio ecológico nas inúmeras regiões da América Latina, a questão social ligada à origem e ao desenvolvimento da doença deve ser levada em consideração. As áreas chagásicas, de endemia, demarcam os padrões sociais da população afetada. Há pobreza, má condição de vida e de educação, além da ausência do poder público ou a má organização deste (DIAS, 1985a, 1985b; DIAS et al., 2016). E mesmo depois de mais de 100

anos de descoberta da doença, ainda há muito a se fazer para diminuir a expansão e a prevalência da doença na população mundial (DIAS et al., 2016).

1.1.3 Os vetores triatomíneos e outros meios de transmissão

A doença de Chagas pode ser transmitida aos humanos através de diversas vias, evidenciando o sucesso evolutivo do *Trypanosoma cruzi*, principal razão da dificuldade de controle da sua infecção (DIAS et al., 2016).

Nos anos seguintes à descoberta da doença, observou-se que a transmissão ocorria majoritariamente pela transmissão vetorial por insetos hematófagos, de domicílio selvagem, peridoméstico ou doméstico, infectados com o *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909; COURA, 2015; DIAS et al., 2016). Esses vetores são insetos hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Mais de 130 espécies são conhecidas. No entanto, somente algumas espécies de três gêneros (*Triatoma sp.*, *Rhodnius sp.* e *Panstrongylus sp.*) são importantes vetores da doença, e eles estão presentes por toda América do Sul, América Central e algumas regiões da América do Norte, como no México e no sul dos Estados Unidos (WHO, 2002; COURA, 2015).

O inseto triatomíneo vive em torno de um ano e meio. Durante este período, as fêmeas podem colocar até 600 ovos. Do ovo eclodido, o inseto, alimentando-se a base de sangue, atravessa cinco fases ninfais para alcançar o estágio adulto, período que pode levar seis meses. A alimentação ocorre ao anoitecer e ao amanhecer, pois são insetos com atividade noturna, e por isso, esse horário do dia é o que exige maior atenção pela população residente de áreas de risco e de endemia (WHO, 2002).

Os triatomíneos são majoritariamente encontrados nos trópicos. No entanto, podem ser vistos também em regiões temperadas, com invernos frios como na Patagônia argentina (*Triatoma infestans* e *Triatoma patagônica*), e nos Estados Unidos (*Triatoma sanguisuga*), mesmo que estas espécies se confinem em micro-habitats com características climáticas diferentes do ambiente externo. Algumas espécies conseguem tolerar grande variação nas condições climáticas seja pelas diferentes temperaturas (*Belminus laportei* e *Triatoma díspar*) ou umidade (*Triatoma breyeri*) (CARVALHO et al., 1998; WHO, 2002). Fatores como clima, temperatura, umidade e disponibilidade alimentícia compõem as peculiaridades de cada espécie.

Graças a grande diversidade e capacidade de adaptação das espécies, atreladas às modificações ecológicas e sociais introduzidas pelo homem, os vetores se adaptaram com sucesso ao domicílio humano (WHO, 2002; COURA; DIAS, 2009). Essas variáveis, também, podem desempenhar papel importante na evolução da doença, definidas pelo tipo de linhagem do *Trypanosoma cruzi* que esteve envolvido na infecção. Devido a elas, uma determinada espécie pode ser um vetor mais importante na transmissão da doença do que outro em determinado país e região (PRATA, 2001; ZINGALES, 2011, 2012).

No Brasil, o principal representante triatomíneo envolvido na transmissão da doença é o *Triatoma infestans*, conhecido popularmente como barbeiro (COURA, 2015). Essa espécie esteve presente em mais de 720 municípios brasileiros (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). No entanto, outras espécies como o *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* também são vetores na transmissão da doença no Brasil, aumentando o risco de endemia por estarem presentes, em conjunto, em mais de dois mil municípios do país (VINHAES; DIAS, 2000; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011; COURA, 2015).

A partir da década de 1950, houve a implementação de campanhas, e programas de profilaxia e de controle do vetor, principalmente do *T. infestans* domiciliado, para diminuir a transmissão do *T. cruzi* e o desenvolvimento da doença de Chagas nas áreas endêmicas e de risco do país (SILVEIRA; DIAS, 2011). Em 2006, a Organização Mundial de Saúde e a Organização Pan-Americana de Saúde certificaram o Brasil quanto a interrupção da transmissão do parasito pelo seu principal vetor. No entanto, a aplicação dessas medidas de controle diminuíram nas duas últimas décadas devido as mudanças de políticas públicas do país, fazendo com que ainda existam focos residuais do *T. infestans*. Além disso, a diminuição do controle também contribui com a domiciliação de novas espécies de triatomíneos com grande potencial colonizador (MS, 2015; DIAS et al., 2016).

A transmissão da doença de Chagas pelo vetor foi, e em algumas regiões ainda é, uma das vias mais importantes, mesmo depois da implementação de controles do triatomíneo e da diminuição relativa da participação na manutenção da doença. Por isso, outros meios de transmissão, principalmente presentes nas regiões urbanizadas, ganharam importância epidemiológica nas últimas décadas. Esses meios alternativos representam riscos à áreas não endêmicas e sem vetor, consequência da migração de indivíduos portadores do *T. cruzi* (WHO, 2010; ANGHEBEN et al., 2011; COURA, 2015; DIAS et al., 2016).

Dentre os demais meios de transmissão alternativos à via vetorial, a transfusão de sangue, de tecido e órgãos foram os mecanismos de infecção mais importantes no aumento da

ocorrência da doença de Chagas em países da América Latina, principalmente nos anos de intensa urbanização das regiões, urbanizando também a própria doença devido a migração da população rural portadora do protozoário parasita (DIAS, 1945; PELLEGRINO, 1951; COURA, 2015; DIAS et al., 2016). Em decorrência disso, os países de endemia como o Brasil, ao longo das décadas, diminuíram consideravelmente a transmissão da doença por essa via graças ao aumento da vigilância sanitária nas transfusões de sangue, de tecidos e órgãos dos bancos de sangue e hospitais (COURA, 2015; DIAS et al., 2016).

O meio de transmissão por transfusão de sangue e transplante de órgãos e tecidos é ainda o mais privilegiado nos países onde não há originalmente o protozoário *T. cruzi* e nem seu vetor, e que receberam milhões de imigrantes de regiões endêmicas. Além disso, essas regiões não estão preparadas adequadamente para lidar com essa via de transmissão, pois não implementaram estratégias na triagem de doadores de sangue, tecido e órgãos, e nem estratégias para lidar com indivíduos portadores do *T. cruzi*, pois os serviços e profissionais de saúde não estão preparados para diagnosticar ou tratar pacientes que manifestem a doença (COURA, 2015; DIAS et al., 2016).

No entanto, é importante ressaltar que casos de infecção provenientes da via oral, através do consumo de frutas e carne crua de animais contaminados, e que carece de controle; e congênita, que tem diagnóstico dificultado, são recorrentes anualmente no Brasil, e ganharam importância epidemiológica maior em relação aos meios ditos controlados, principalmente na região amazônica, além de serem responsáveis por surtos de infecção em diversos estados da federação (MS, 2015; COURA, 2015; DIAS et al., 2016; ANTUNES et al., 2016).

A partir do momento que ocorre a transmissão, a doença é dividida em dois estágios conhecidos como fase aguda e fase crônica, onde esta última é dividida em fase indeterminada e determinada. Os sintomas marcantes de cada fase podem se desenvolver imediatamente ou podem passar despercebidos caso se manifestem de forma branda. Em muitos casos, levam anos para se manifestarem ou não ocorrem pelo resto da vida do indivíduo portador do *T. cruzi* (WHO, 2002, 2010).

1.1.4 Manifestação clínica

A fase aguda é o conjunto de manifestações clínicas iniciais, específicas ou não, que podem surgir após a inoculação do *Trypanosoma cruzi* e após um período de incubação que varia entre diversas semanas ou meses, a depender da via de transmissão e de outras características epidemiológicas (LINDSEY et al., 2015).

Quando a infecção ocorre pela via vetorial, é possível identificar uma inflamação na área pela qual o vetor se alimentou. Como o vetor costuma se alimentar pela região do rosto, é possível que o local de infecção seja perto dos olhos, e por esse motivo, há uma inflamação específica na região chamada de sinal de Romana. Em seguida, devido à infecção generalizada (alta parasitemia), pode ocorrer o aparecimento de febre, taquicardia, arritmia cardíaca, edema, mal-estar, cefaleia, diarreia, vômito, anorexia, hepatomegalia, entre outros. Esses sintomas são comuns às demais vias de transmissão, também (PRATA, 2001; PARKER; SETHI, 2011; LINDSEY et al., 2015). As manifestações clínicas dessa fase podem durar até oito semanas. Como elas se desenvolvem mais em crianças e adolescentes, o risco de morte nestes indivíduos é maior e ocorre em até 10% dos pacientes. No entanto, na maioria dos casos, a fase aguda pode passar despercebida ou é assintomática, dificultando seu diagnóstico e tratamento. Além disso, a ausência dos sintomas é muito comum na transmissão congênita, tornando-se um risco maior para recém-nascidos (PRATA, 2001; WHO, 2002; PARKER; SETHI, 2011; DIAS et al., 2016).

Caso se desconfie da infecção e/ou os sintomas estejam presentes, os fatores epidemiológicos da região e da população são muito importantes para o diagnóstico correto. Como o parasita está bem disseminado no sangue, ele pode ser facilmente detectado pela análise direta em microscopia de luz. Caso a análise direta da presença do *T. cruzi* no sangue seja negativa, mas os sintomas ou suspeitas continuem presentes, a confirmação da infecção pode ser feita por metodologias mais específicas como: a identificação de anticorpos para o *T. cruzi*, decorrente da resposta imunológica normal do paciente à alta parasitemia. Caso os sintomas sejam mais específicos, o eletrocardiograma e o raios-X do tórax podem mostrar sinais de comprometimento cardíaco (PRATA, 2001; WHO, 2002; LINDSEY et al., 2015; DIAS et al., 2016). Após o tempo de duração da fase aguda, os sintomas, quando presentes, desaparecem, sem aparente sequela (WHO, 2002).

A fase crônica indeterminada ocorre após o desaparecimento dos sintomas da fase aguda e é caracterizada pela ausência de manifestações clínicas. Estima-se que entre 40% e

90% da população portadora do *T. cruzi*, a depender da região, esteja nessa fase (RIBEIRO; ROCHA, 1998; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010), e que de 50 a 70% dela permanecerá nessa condição pelo resto da vida (WHO, 2002; LINDSEY et al., 2015). Além disso, mesmo na tentativa de diagnosticar a doença nessa fase, os exames radiológicos do coração, esôfago, sistema digestório são normais, assim como os eletrocardiogramas. Mas outros testes como a reação em cadeia da polimerase (PCR), a reação sorológica e o xenodiagnóstico podem comprovar a infecção (PRATA, 2001; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Tendo em vista as dificuldades presentes no diagnóstico dessa fase da doença de Chagas, o interesse científico na investigação de sinais específicos da forma indeterminada, para confirmação de suspeitas, estimulou a aplicação de testes cardiológicos, digestivos e decorrentes de disfunções neurológicas e o estudo de seus resultados a fim de caracterizar de forma mais precisa esse estágio da doença (RIBEIRO; ROCHA, 1998; PRATA, 2001).

A avaliação do sistema nervoso autônomo parassimpático e simpático demonstra algumas mudanças. Elas foram encontradas no comprometimento da produção da saliva e do suor, do funcionamento normal da vesícula biliar, da pressão sanguínea, das pressões esofágicas e gástricas, além de perturbações nos níveis normais de neurotransmissores como da acetilcolina, catecolaminas e enzimas relacionadas (WHO, 2002). Testes invasivos (biópsia) podem revelar lesões localizadas no miocárdio de 60% dos pacientes (PRATA, 2001). Além disso, pode-se verificar processos fibróticos e lesões no sistema nervoso autônomo intracardíaco (RIBEIRO; ROCHA, 1998).

Mas devido ao estado assintomático da doença, a aplicação desses testes não é considerada caso as características epidemiológicas do paciente sejam ignoradas. E apesar de uma pequena parcela dos pacientes apresentarem alguma anormalidade nestes testes, o mesmo quadro clínico pode ser observado também em indivíduos sadios, comprometendo a validade dos resultados para a caracterização da forma indeterminada da doença de Chagas (RIBEIRO; ROCHA, 1998; PRATA, 2001).

O tempo entre a fase crônica indeterminada e determinada, com o surgimento dos primeiros sintomas, pode chegar a 30 anos (PARKER; SETHI, 2011). Quando a doença evolui para a fase crônica determinada, inúmeros tecidos do corpo já podem estar comprometidos pelo parasita. Este estágio da doença é o mais severo e pode atingir o coração, o sistema digestório e o sistema nervoso periférico (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A forma cardíaca da doença é a mais comum e a mais perigosa (PRATA, 2001; PARKER; SETHI, 2011; DIAS et al., 2016). Estudos das áreas endêmicas apontam que 2% dos pacientes na fase indeterminada evoluem para a forma cardíaca da doença todo ano. A

fase inicial das complicações cardíacas é suave, discreta e não específica. O eletrocardiograma e o ecocardiograma detectam pequenas anormalidades no funcionamento do coração. Esse quadro clínico pode continuar dessa forma por toda vida. No entanto, alguns desses pacientes evoluem para um quadro severo da forma cardíaca da doença de Chagas (PRATA, 2001). As principais manifestações clínicas da forma severa são as arritmias em consequência das lesões no miocárdio, os bloqueios átrio e intraventriculares, e a insuficiência cardíaca (PRATA 2001; WHO, 2002; PARKER; SETHI, 2011; DIAS et al., 2016).

A doença de Chagas também é responsável pelo comprometimento de diversos órgãos do sistema digestório do paciente. Em áreas endêmicas, 15 a 20% dos indivíduos infectados desenvolvem alterações na motilidade, na secreção e na absorção do sistema digestório, especialmente no esôfago e no cólon, que aumentam de tamanho (megaesôfago e megacólon) (PRATA, 2001; DIAS et al., 2016).

O sistema nervoso periférico (SNP) e autônomo (SNA) também podem estar comprometidos. Cerca de 10% dos pacientes que desenvolvem a doença apresentam pelo menos uma manifestação clínica relacionada a perturbações no SNP. Neurite, destruição dos neurônios motores e das fibras nervosas sensoriais são algumas das causas para as anormalidades sensoriais dos pacientes. O comprometimento do SNA se relaciona a denervação do sistema nervoso parassimpático e simpático, e justificam as manifestações clínicas relacionadas ao coração como arritmia e morte súbita, e a motilidade do sistema digestório (RIBEIRO et al., 2001; PRATA, 2001; PARKER; SETHI, 2011).

1.1.5 Prognóstico

O prognóstico da doença de Chagas está diretamente relacionado a fase da doença desenvolvida pelo paciente. A fase aguda, que costuma ser assintomática ou branda em adultos, é muito severa em crianças até dois anos de idade e pode ser fatal a depender das manifestações clínicas desenvolvidas. Além disso, a infecção pela transmissão congênita pode levar ao aborto da criança ou, caso ela nasça, gerar lesões permanentes no coração, fígado, rins e sistema nervoso central (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

A fase crônica possui grande heterogeneidade e por isso, apresenta um prognóstico dependente da evolução da doença. No caso dos pacientes que desenvolveram a fase crônica digestória, o prognóstico costuma ser bom, sem que se tenha observado mortalidade em um

período de dez anos de evolução desta fase (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Em contrapartida, as taxas de mortalidade da doença de Chagas são maiores em pacientes que desenvolveram as complicações cardíacas da patologia quando comparadas àqueles que são acometidos pelas digestórias (TRAINA et al., 2012; LINDSEY et al., 2015).

O risco de morte súbita é alto (BERN et al., 2007), atingindo até 38% dos pacientes com insuficiência cardíaca (PRATA, 2001). O acidente vascular encefálico também é um risco e atinge até 15% dos casos (RASSI; RASSI; RASSI, 2001). As complicações cardíacas da doença de Chagas são as maiores responsáveis pela mortalidade destes pacientes, respondendo por aproximadamente vinte e uma mil mortes por ano, e pioram progressivamente a medida que os pacientes envelhecem (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; LINDSEY et al., 2015).

1.1.6 Tratamento da doença de Chagas

A OMS estabelece que a droga ideal para o tratamento da doença de Chagas (atividade tripanocida) deve cumprir com os seguintes requisitos: (i) apresentar cura parasitológica na fase aguda e crônica da doença; (ii) ser eficaz em uma ou algumas doses; (iii) ser acessível aos pacientes a um custo baixo; (iv) não ter efeitos colaterais ou teratogênicos; (v) não induzir resistência (COURA; CASTRO, 2002).

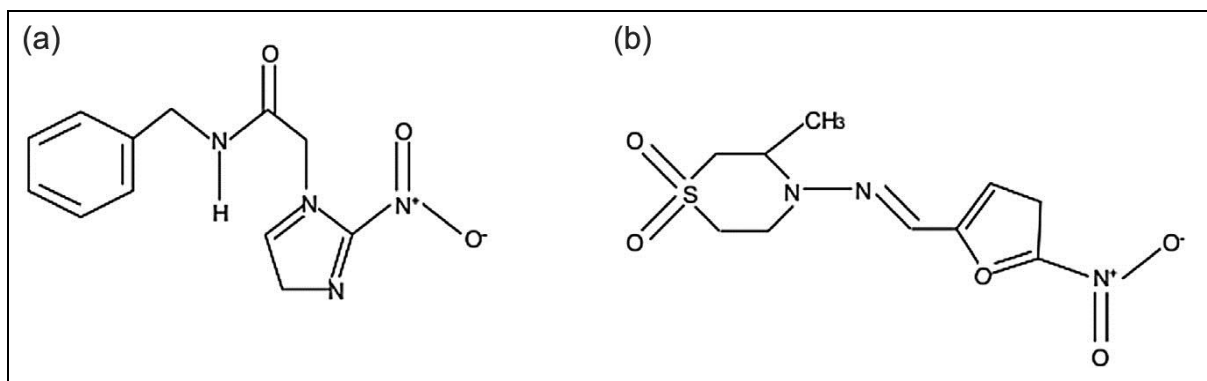
Atualmente, apenas duas drogas são recomendadas e estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: nifurtimox (NF) e benzonidazol (BNZ).

O nifurtimox (Figura 4) é um nitrofurano (3-metil-4-[(5-nitrofurfuriledeno)-amino]-tiomorfolina-1,1-dióxido), lançado comercialmente em 1967, que atua na geração de radicais livres pelas enzimas nitroredutases, as quais, na presença do oxigênio, geram intermediários tóxicos ao DNA do *Trypanosoma cruzi*, já que este é parcialmente deficiente nos mecanismos de desintoxicação destes intermediários (COURA; CASTRO, 2002).

Ferreira (1961, 1962) e Ferreira, Prata e Rassi (1963) utilizaram pela primeira vez os nitrofurazonas em pacientes na fase aguda alcançando bons resultados clínicos com alguns poucos efeitos colaterais e certa taxa de cura demonstrada pelo xenodiagnóstico. Na fase crônica, alguns autores (COURA et al., 1961, COURA; SILVA, 1961, COURA; FERREIRA; SILVA, 1962) trataram os pacientes por longo prazo, mas suspenderam o tratamento devido aos efeitos colaterais, que variavam de pessoa para pessoa, além da baixa taxa de cura. Os

efeitos adversos são anorexia, perda de peso, mudanças psicológicas, excitabilidade ou insônia, náusea, diarreia, vômito e cólicas intestinais (COURA; CASTRO, 2002; LOUP et al., 2011).

Figura 4: Fórmula estrutural do benzonidazol e do nifurtimox.



Legenda: (a) Estrutura do benzonidazol; (b) Estrutura do nifurtimox.

Fonte: BERMUDEZ et al., 2016.

A utilização do NF foi suspensa na década de 1980 no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai (COURA; CASTRO, 2002). Em 1997, a produção foi totalmente suspensa devido à falta de demanda. No entanto, em 2000, em acordo com a OMS, a produção recomeçou para dar suporte ao tratamento da tripanossomíase africana (JANNIN; VILLA, 2007) e pode ser administrada, no Brasil, em pacientes com baixa tolerância ao BNZ, através de pedido especial do Ministério da Saúde (DIAS et al., 2016).

O benzonidazol (Figura 4) é um nitroimidazol (2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida), lançado comercialmente em 1972, que atua inibindo a síntese proteica e a cadeia respiratória, e seus metabólitos estabelecem ligações covalentes com o DNA. Em comparação ao NF, gera menos radicais livres (APT, 2010).

Assim como o NF, o BNZ apresenta inúmeros efeitos colaterais que variam em relação à dose administrada, faixa etária dos pacientes (CARRILERO et al., 2011) e a origem geográfica destes, e em consequência disto, a linhagem de *T. cruzi* na infecção (COURA; CASTRO, 2002). Os efeitos adversos são hipersensibilidade no início do tratamento, efeito tóxico na medula óssea, dermatite, febre, dores nas articulações e músculos, e neuropatias periféricas ao final do tratamento. Esses efeitos podem levar a suspensão do tratamento (COURA; CASTRO, 2002; LOUP et al., 2011).

A eficácia destes dois medicamentos ainda gera muitas dúvidas devido às taxas variáveis de cura e na eliminação dos sintomas (Figura 5) (DIAS et al., 2016). Além disso, a

tolerância dos pacientes aos efeitos colaterais deve ser considerada (MORRILO et al, 2015). Na fase aguda da doença de Chagas, o tratamento (benzonidazol) apresenta boa eficácia, com até 100% de chance de cura, principalmente em recém-nascidos e crianças. A recomendação da aplicação do tratamento nesta fase é irrestrita e independente da via de transmissão (APT, 2010; DIAS et al., 2016). Por isso, é importante que a identificação da fase aguda ocorra o mais rápido possível, pela identificação de sintomas quando presentes e pela vigilância epidemiológica em áreas de endemia ou de risco, disponibilizando testes mais sensíveis para confirmação da infecção a fim de agilizar a aplicação do tratamento tripanocida e dos sintomas (COURA; CASTRO, 2002; DIAS et al., 2016).

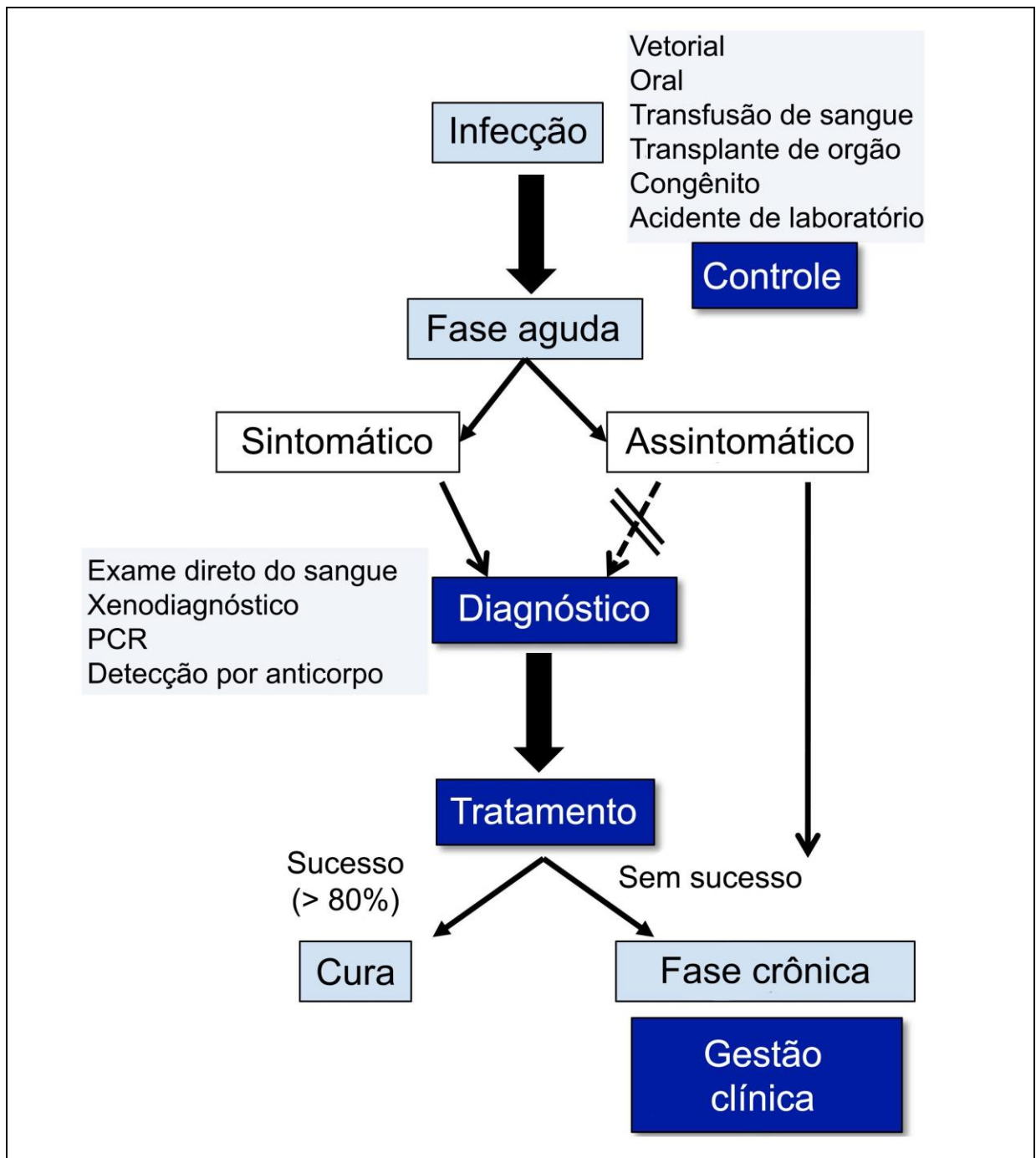
No entanto, é na fase crônica, tanto indeterminada quanto determinada, que está presente o maior desafio na definição da eficácia do tratamento. Os autores do primeiro estudo randomizado na análise da eficácia do benzonidazol em pacientes (2854) com a forma crônica cardíaca da doença de Chagas, concluíram que o tratamento (BNZ) disponível não diminui a progressão da doença, apesar de ter reduzido a detecção de parasitas circulantes em até cinco anos. Porém, os autores sugerem também que outras variáveis podem influenciar na eficácia do tratamento (MORRILO et al., 2015).

A constituição genética do parasita dos seis grupos de *T. cruzi* (I a VI) parece ser importante na suscetibilidade das cepas ao tratamento com o BNZ e NF, e possivelmente de novas substâncias (CAMANDARROBA et al., 2003; TOLEDO et al., 2004; ZINGALES, 2011; ZINGALES et al., 2012; MORRILO et al., 2015). Existem evidências de resistência natural ou maior sensibilidade de determinadas cepas aos medicamentos (FILARDI; BRENER, 1987). Dados epidemiológicos mostram maior sensibilidade do *T. cruzi* ao BNZ em países do cone norte (YUN et al., 2009). Outros estudos apontam que a superexpressão ou deficiência de enzimas nitroredutases tipo 1 modulam a resistência ou sensibilidade do parasita ao NF (HALL; BOT; WILKINSON, 2011).

As dificuldades farmacológicas envolvidas no tratamento da doença de Chagas são resultantes da falta de novos estudos epidemiológicos e metodológicos para relacionar os grupos infectantes do *T. cruzi* às manifestações clínicas (MARIN-NETO et al., 2009; ZINGALES, 2011). Em consequência dessas dificuldades, a falta de consenso internacional quanto à escolha de um determinado procedimento em relação a um grupo de pacientes é evidente. A aplicação do tratamento deveria estar de acordo com diversas variáveis, pois as chances de cura apresentam valores distintos a depender da idade do paciente, do tempo de infecção, da região, da evolução da doença, do meio de transmissão, do tempo de tratamento, da concentração do fármaco administrado, entre outros fatores (FERREIRA, 1990;

BUSCHINI et al., 2007; JANNIN; VILLA, 2007; MARIN-NETO et al., 2009; ZINGALES, 2011; COURA; CASTRO, 2002; MORRILLO et al., 2015). O consenso mais antigo é que o diagnóstico precoce da doença configura um bom prognóstico a ela (JANNIN; VILLA, 2007). No entanto, esforços para melhorar essa situação tem sido realizados, como pode ser visto nas sugestões apresentadas no II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (DIAS et al., 2016).

Figura 5: Desafios na doença de Chagas: controle, diagnóstico, tratamento e gestão clínica.



Fonte: adaptado de ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014

A OMS propõe, além do controle do vetor nas áreas endêmicas, (i) o acesso dos medicamentos para os pacientes e toda infraestrutura necessária para tal; (ii) o estímulo a criação de um consenso entre os países afetados para definir precisamente o melhor tratamento a ser aplicado; (iii) a pesquisa e o desenvolvimento de melhores ferramentas para diagnóstico e novas substâncias bioativas seguras (WHO, 2006).

No entanto, além de menos de 1% das pessoas portadoras do *T. cruzi* receberem tratamento, que tem eficácia variável, conclui-se que o desenvolvimento de novos medicamentos tripanocida, novas estratégias na gestão clínica, novos estudos clínicos randomizados para determinar a eficácia do tratamento atual e de tratamentos futuros com novos fármacos são urgentes, principalmente para a população mais antiga infectada e com prognóstico ruim (MAGUIRE, 2015; MORRILO et al., 2015; DIAS et al., 2016).

1.2 Novas substâncias bioativas em desenvolvimento

1.2.1 Metas de desenvolvimento

O tratamento disponível para a doença de Chagas, com nifurtimox e benzonidazol, gera variada resposta tanto na resolução dos sintomas gerados pela infecção quanto na taxa de cura efetiva da doença. Nessas condições, é urgente o desenvolvimento e disponibilidade de novas alternativas terapêuticas ou o melhoramento das existentes pela comunidade científica e pelas indústrias farmacêuticas para atender aos milhões de portadores do protozoário *Trypanosoma cruzi* (CLAYTON, 2010; BERMUDEZ, et al., 2016).

No desenvolvimento de novas substâncias bioativas para o tratamento da doença de Chagas, é importante considerar e estabelecer metas de acordo com conhecimento biológico do metabolismo do *T. cruzi* durante a infecção a fim de determinar uma atividade farmacológica de interesse e eficaz. Muitas estratégias e muitos alvos moleculares do *T. cruzi* estão sendo explorados, mas é importante priorizar, se possível, fatores que considerados desde o início do desenvolvimento da nova molécula, garantam a eficácia do tratamento e acelere todo o procedimento que já é naturalmente lento (ZINGALES et al., 2014; BERMUDEZ et al., 2016).

A forma evolutiva amastigota intracelular do parasito é a forma proliferativa no hospedeiro vertebrado, e por isto, acredita-se ser o alvo farmacológico mais importante. A ação na forma tripomastigota também é relevante, pois elas derivam da forma amastigota e estão presentes no pico da parasitemia no sangue, da fase aguda. No entanto, deve-se ter cuidado na análise da atividade tripanocida nas demais fases do ciclo de vida do protozoário, como na epimastigota, pois a eficácia nessas fases pode não se estender as formas evolutivas mais importantes da infecção do *T. cruzi* (NEAL; VAN BUEREN, 1998; ANDRADE et al., 2000; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006; ZINGALES et al., 2014).

A atividade em diferentes linhagens do *T. cruzi* é importante para garantir a aplicabilidade do fármaco em diferentes regiões endêmicas e não endêmicas da doença. Acredita-se que as análises do efeito tripanocida da nova substância devem ser realizadas com no mínimo duas linhagens do parasito e dois clones da mesma linhagem, com prioridade a linhagem que esteja mais associada com a infecção humana, sendo ela a *T. cruzi* I, linhagem com maior abrangência territorial (ZINGALES et al., 2014).

Outros fatores que não são específicos a infecção pelo *T. cruzi*, mas relevantes no desenvolvimento de qualquer nova substância de interesse farmacológico também são imprescindíveis como: (i) baixa interação com diversas famílias de enzimas do citocromo P450 ou que atuem em diferentes sítios alvos para evitar a interação medicamentosa, pois muitos pacientes utilizam medicamentos antiarrítmicos, anticoagulantes e outros, para o tratamento dos sintomas gerados pela doença; (ii) alta solubilidade da substância é crucial para garantir a disponibilidade desta no plasma humano, problema que afeta a eficácia do benzonidazol, por exemplo; (iii) inexistente ou baixa atividade mutagênica, genotóxica e teratogênica são exigências básicas no desenvolvimento de novos fármacos, para não gerar efeitos adversos mais graves durante o tratamento ou muitos anos depois dele; (iv) que seja ativo por via oral e preferencialmente em poucas doses; (v) o custo final do medicamento deve ser baixo para permitir a disponibilidade em áreas mais pobres, principais regiões afetadas pela infecção e doença; (vi) entre outros fatores regulamentados por agências competentes de cada país (COURA; CASTRO, 2002; NWAKA; HUDSON, 2006; OECD, 2009; BERMUDEZ et al., 2016).

1.2.2 Novas substâncias bioativas para a doença de Chagas

Como dito anteriormente, alguns alvos moleculares do *Trypanosoma cruzi* estão sendo estudados para a síntese de novas moléculas, e que para isso seja feita corretamente, devem ser levadas em consideração todas as características epidemiológicas do parasito. Mas também é importante considerar na escolha de novos alvos moleculares, a relevância deles no metabolismo do parasita para viabilizar o desenvolvimento de um novo tratamento eficiente e altamente específico a esses alvos, garantindo que um novo medicamento interfira apenas na sobrevivência e virulência do protozoário, e não na saúde do hospedeiro (LEPESHEVA; VILLALTA; WATERMAN, 2011; ZINGALES et al., 2014; BERMUDEZ et al., 2016).

Dentre os alvos moleculares explorados, a hemoproteína 14 α -desmetilase ou proteína CYP51, da família de enzimas do citocromo P450, enzima envolvida na produção do ergosterol, importante constituinte da membrana celular do parasita e precursor metabólico de inúmeras vias de sinalização molecular, é alvo de novas substâncias, conhecidas como inibidores da biossíntese de ergosterol. Ao interferir nas vias de sinalização e na integridade da membrana celular, o *T. cruzi* morre por ter seu metabolismo normal prejudicado e além disso, ele é incapaz de utilizar vias alternativas ou constituintes alternativos, como o colesterol do hospedeiro. Esta via molecular tem sido inibida por novas substâncias com sucesso em análises *in vitro* e *in vivo* (LEPESHEVA et al., 2007; KEENAN; CHAPLIN, 2015).

O posaconazol (URBINA et al., 1998) é um importante derivado da família dos triazóis com atividade antifúngica de amplo espectro. Em modelos *in vitro*, o posaconazol apresentou atividade tripanocida relevante nas formas epimastigota e amastigota tratadas com concentrações em escala nanométricas. Em modelos *in vivo* de murinos infectados com o *T. cruzi*, a administração oral do derivado atingiu taxas de cura de até 100%, a depender da variável estudada no modelo. Além disso, a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* quando comparadas ao nifurtimox e ao benzonidazol foi mais relevante, principalmente na prevenção das lesões cardíacas (URBINA et al., 1998; OLIVIERI et al., 2010). Mas ainda existem dúvidas quanto a eficiência do posaconazol no tratamento de diferentes linhagens de *T. cruzi* (MORAES et al., 2014).

No entanto, apesar da atividade tripanocida promissora demonstrada nos estudos realizados, nas análises de fase clínica com humanos manifestando sintomas da fase crônica da doença, o tratamento com o posaconazol apresentou menor eficácia ou falha no tratamento (80 a 92%) quando comparado a atividade do benzonidazol (38%), apesar de ter sido bem

tolerado, sem sérios efeitos adversos (MOLINA et al., 2014). Porém, mesmo em decorrência desse resultado, acredita-se que este derivado do triazol ainda tem potencial: (i) de ser utilizado em terapias combinadas, inclusive com o benzonidazol; (ii) de ter sua disponibilidade no plasma humano, que é baixa (20%), melhorada através de novos estudos; (iii) e de ajustamento do calendário de administração, que pode ser prolongado, já que a substância é bem tolerada (BENAIM et al., 2006; MOLINA; SALVADOR; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, 2015). Além disso, outras substâncias da família dos azóis apresentam atividade tripanocida interessante e estão sendo estudadas (URBINA et al., 2003a, 2003b; SILVA et al., 2012; MARTINS et al., 2015).

Outra via metabólica explorada viabilizou a descoberta e síntese de um promissor grupo de substâncias com atividade tripanocida (MCKERROW; MCGRATH; ENGEL, 1995). A cruzaina, uma protease de cisteína, é a primeira molécula a ser expressa durante a infecção de hospedeiros mamíferos pelo *T. cruzi* (HARTH et al., 1993). Ela está envolvida na replicação e diferenciação do parasito. Sendo assim, a estratégia proposta é desenvolver inibidores da cruzaina (cisteína protease) a fim de frear o crescimento e a proliferação do protozoário no hospedeiro (MCKERROW; MCGRATH; ENGEL, 1995).

O dipeptídeo vinil sulfona K777 (ENGEL et al., 1998) é um importante inibidor irreversível da cruzaina. Em modelos *in vitro* com macrófagos infectados por *T. cruzi* (forma evolutiva amastigota), o K777 foi capaz de impedir o crescimento do parasito e apresentou taxas de cura de 100% após seis dias de tratamento. Em modelos *in vivo* com murinos infectados, o dipeptídeo vinil sulfona foi capaz de curar camundongos, que sobreviveram por meses sem apresentar sintomas ou indícios de infecção (ENGEL et al., 1998). Modelos *in vivo* utilizando camundongos imunossuprimidos e imunocompetentes também comprovaram o perfil protetor do K777, impedindo a morte desses animais e o desenvolvimento de sintomas cardíacos por semanas quando comparados ao controle negativo, sem que apresentassem quaisquer traços da infecção (DOYLE et al., 2007). Em modelo animal utilizando cachorros da raça *Beagle* infectados, também foi possível observar a eficácia devido à melhora dos sintomas desenvolvidos na fase crônica cardíaca da doença (BARR et al., 2005). No entanto, em 2013, a molécula K777 teve seus testes clínicos interrompidos devido a descobertas quanto a intolerabilidade de baixas doses em modelos animais com primatas e cachorros (NUNO, 2015).

Produtos naturais também apresentam atividade tripanocida, e seus diversificados mecanismos de ação estão sendo investigados. A molécula lignano-lactones da planta *Piper cubeba* apresentou atividade *in vivo* em ratos infectados com o *T. cruzi*, reduzindo a infecção

em tecidos, com boa resposta na administração oral (SARAIVA et al., 2006; ESPERANDIM et al., 2010). A planta *Peumus boldus*, popularmente conhecida como boldo, bloqueia a cadeia respiratória do protozoário (MORELLO et al., 1994). Triterpenos da *Arrabidaea triplinervia* (LEITE et al., 2006) e seus derivados, e terpenoides isolados da *Pinus oocarpa* (RUBIO et al., 2005), apresentam atividade contra as formas epimastigota e tripomastigota. Apesar da atividade destes produtos naturais, a grande maioria não foi submetida a estudos experimentais *in vivo* (APT, 2010).

O *Trypanosoma cruzi* não sintetiza enzimas como a catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, envolvidas no metabolismo das espécies reativas de oxigênio. No entanto, enzimas equivalentes na captura de espécies reativas como peróxidos e superóxidos são expressas constituindo o sistema de defesa antioxidante do parasita. Dentre essas enzimas, a mais importante é a tripanotiona reductase (BOVERIS et al., 1980; IRIGOÍN et al., 2008). Em decorrência destes mecanismos do parasito, fármacos capazes de induzir estresse oxidativo ou que inibam estas enzimas são de grande interesse, e os nitrocompostos parecem atuar de forma competente nessas vias (VIODÉ et al., 1999; MORAES et al., 2014; BOECHAT et al., 2015).

Além da síntese e análise de substâncias inéditas, também é possível aplicar diversas estratégias que busquem descobrir se existe alguma atividade farmacológica nos medicamentos que já estão no mercado, mas que anteriormente não era conhecida. Ou seja, avaliar medicamentos utilizados no tratamento de determinadas doenças, em novas doenças, procurando subtrair o tempo e os custos no desenvolvimento e análises toxicológicas de uma nova molécula. Diversas doenças negligenciadas, como a malária e a leishmaniose, se beneficiaram do redirecionamento de fármacos que antes eram utilizados em outros tipos de tratamentos (ANDREWS; FISHER; SKINNER-ADAMS, 2014).

1.3 Desenvolvimento de novos nitro-heterocíclicos

1.3.1 Nitroimidazois

Os compostos do grupo nitroimidazol pertencem à classe dos nitro-heterocíclicos aromáticos que têm grande relevância no uso medicinal, principalmente pela atividade

antifúngica, com representantes já disponíveis no mercado (CELIK; ARAS-ATES, 2006; MITAL, 2009). O espectro de ação desses compostos é tão amplo que a atividade dessas moléculas está sendo analisada: (i) no tratamento do câncer, como radiosensíveis (ADAMS; STRATFORD, 1986; ADAMS, 1992; ADAMS; STRATFORD, 1994; KARNTHALER-BENBAKKA et al., 2016); (ii) no controle da fertilidade (KAPOOR et al., 2003); (iii) no tratamento da tuberculose (NAGARAJAN et al., 1989; GUNAY et al., 1999; PODANY; SWINDELL, 2016); (iv) no tratamento da leishmaniose (POORRAJAB et al., 2009; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015); (v) na inibição da enzima transcriptase reversa do vírus da síndrome da imunodeficiência (HIV) (SILVESTRI et al., 2000; SILVESTRI et al., 2002; AL-SOUD et al., 2007); (vi) entre outros (MITAL, 2009).

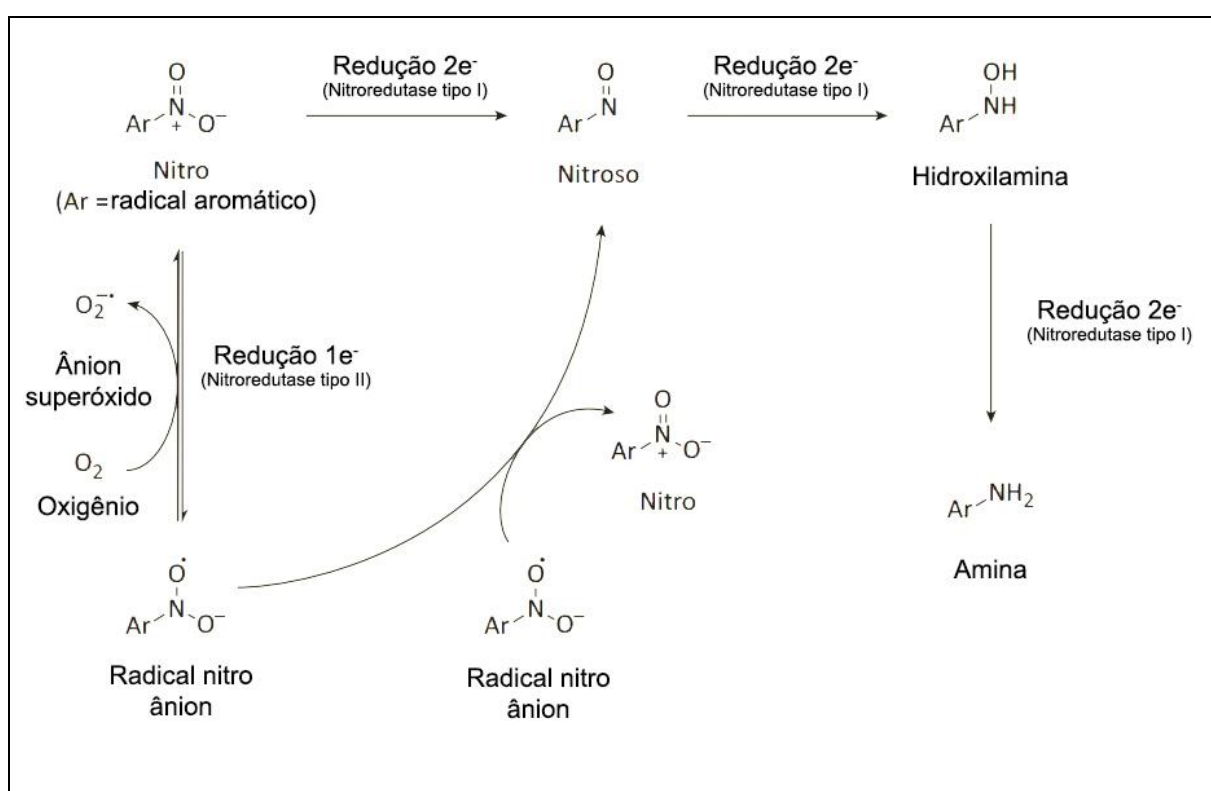
Dentre os compostos desse grupamento químico, ao qual o benzonidazol faz parte, também é relatada a atividade tripanocida, que é a razão pelo crescente interesse no desenvolvimento de novos fármacos contendo esse grupamento, como alternativa ao tratamento atual da tripanossomíase americana e africana, e outras doenças negligenciadas (BOUTEILLE et al., 1995; ENANGA et al., 1998; BOUTEILLE; CHAUVIERE, 1999; BUSCHINI et al., 2007; MITAL, 2009; KEENAN; CHAPLIN, 2015).

No entanto, a maioria das substâncias do grupo nitroimidazol tem efeito mutagênico e tóxico em bactérias. Esse efeito pode ser explicado pela presença de nitroredutases nesses organismos (MORAIS et al., 1998). A redução de um elétron nestes compostos leva a geração de um ânion radical instável nitro que pode se decompor em ânion nitrato e radical imidazol, ou ser reduzido por um segundo elétron, formando intermediários nitrosos mais estáveis que seriam biologicamente ativos, reagindo com o DNA (Figura 6; MASON; JOSEPHY, 1985; HEIN, 1988; EDWARDS, 1993; PATTERSON; WYLLIE, 2014). Na presença de oxigênio, o elétron do ânion radical nitro poderia ser sequestrado por ele regenerando o composto-fonte e formando superóxido, gerando um ciclo fútil (MITAL, 2009; PATTERSON; WYLLIE, 2014). Mas esta via de redução enzimática não é tão eficaz nas células de mamíferos, o que diminuiria este efeito mutagênico (EHLHARDT et al., 1988). Porém, a genotoxicidade em modelos *in vitro* utilizando cultura de células de mamíferos foi relatada (POLI et al., 2002, NESSLANY et al., 2004; MELLO et al., 2013; BOECHAT et al., 2015).

O metronidazol (1-hidroxetil-2-metil-5-nitroimidazole) (MTZ) é um dos compostos mais estudados do grupo dos nitroimidazois (MITAL, 2009). Ele é bem tolerado em ratos, sem apresentar toxicidade crônica em doses até 150 mg/kg, administradas até 80 semanas. Macacos ainda apresentaram menor sensibilidade em doses até 225 mg/kg, sem apresentar efeitos colaterais (ROE, 1977, 1983). Em humanos, o MTZ é bem tolerado e está entre as

drogas mais utilizadas por gestantes no mundo (ROE, 1985; MITAL, 2009). No entanto, O MTZ também é mutagênico nos testes bacteriológicos com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *Escherichia coli* (*E. coli*), que são bactérias anaeróbicas facultativas. Em ambiente anaeróbico, há interação e ligação com o DNA, além de se observar quebras. Contudo, o MTZ não apresenta efeito mutagênico em células de mamífero em testes *in vitro*. O teste do micronúcleo é negativo e aberrações cromossômicas só são vistas em condições anaeróbicas (MITAL, 2009).

Figura 6: Redução por 1 ou 2 elétrons de compostos nitroaromáticos.



Fonte: adaptado de PATTERSON; WYLLIE, 2014.

Teoricamente, todo nitrocomposto já avaliado apresenta potencial mutagênico para ensaios com bactéria, e genotóxico em cultura de células de linhagens permanentes e primárias eucariotas. Essa atividade tóxica pode variar de acordo com a posição do grupo nitro na molécula, diminuindo consideravelmente esta atividade deletéria (WALSH et al., 1987). Porém, também, é possível observar uma variável resposta tripanocida quando são realizadas alterações da estrutura molecular, constituindo o desafio atual no desenvolvimento de novas substâncias (CHAUVIÉRE et al., 2003; BOECHAT et al., 2015; PAPADOPOULOU et al., 2015).

O possível potencial mutagênico dos metabólitos destes compostos formados em humanos ainda precisa ser estudado para elucidar o metabolismo do grupo nitroimidazol no DNA humano e outros alvos passíveis de dano (PUROHIT; BASU, 2000). Com esse conhecimento, buscar desenvolver um derivado ou análogo nitro-heterocíclico com boa resposta farmacológica, e sem ou diminuído potencial tóxico, garantindo a segurança na utilização de concentrações seguras, mas ainda competentes no tratamento de doenças (MITAL, 2009).

1.3.1.1 Megazol

O megazol [2-amino-5-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)-1,3,4-tiadiazol] (Figura 7), sintetizado em 1968 por Berkelhammer e Asato (1968) e caracterizado por Filardi e Brener (1982), é um derivado de 5-nitroimidazol, da classe dos nitro-heterocíclicos, com atividade tripanocida e bactericida (BERKELHAMMER; ASATO, 1968; DE CASTRO; MEIRELLES, 1990).

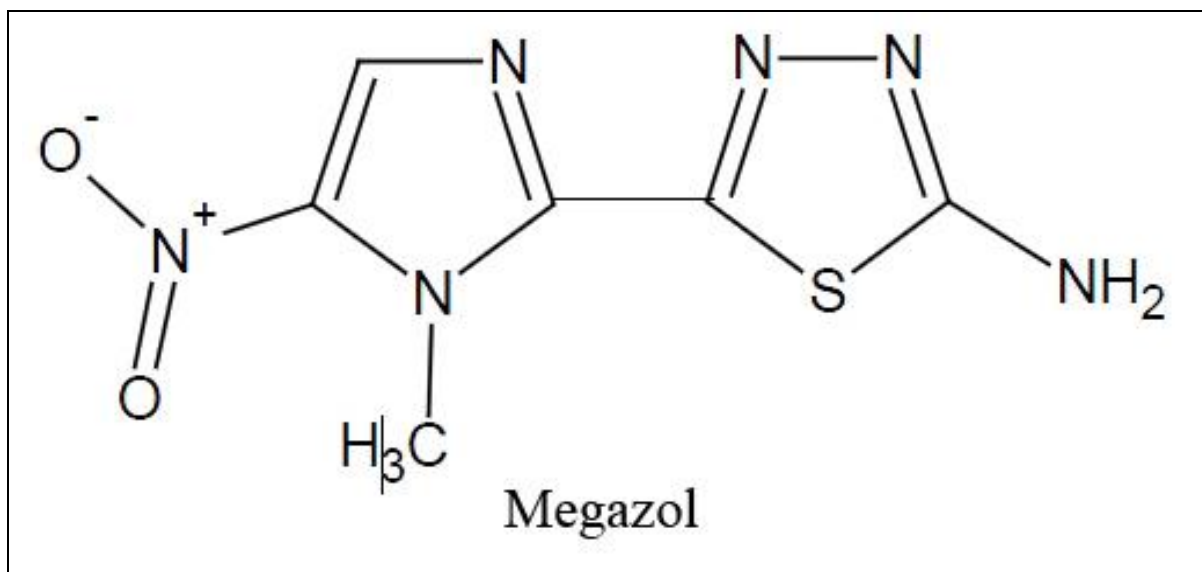
Ratos e frangos infectados com os protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica* foram tratados com o megazol, que apresentou alta taxa de cura para estas infecções (BERKELHAMMER; ASATO, 1968). Winkelmann et al. (1977) também avaliaram e demonstraram a eficácia do megazol no tratamento de ratos infectados com *T. cruzi* e *Trypanosoma brucei*. Em relação aos medicamentos utilizados atualmente no tratamento da doença de Chagas, estudos comparativos do megazol mostraram um perfil superior de ação, utilizando menores concentrações (FILARDI; BRENER, 1982; ALBUQUERQUE; PERIE, 1999; CHAUVIÉRE et al., 2003), além de ser mais efetivo contra as linhagens que são resistentes ao NF e BNZ (FILARDI; BRENER, 1984, 1987).

De Castro e Meirelles (1986) demonstraram: (i) maior eficácia do megazol em relação ao BNZ na inibição da proliferação da forma amastigota do parasita; (ii) capacidade similar de modificar estruturalmente as células amastigotas e tripomastigota entre as três drogas; (iii) maior eficácia do megazol no tratamento de células cardíacas no controle da interiorização do parasita.

Ao analisar o mecanismo de ação do megazol, é possível observar semelhanças e diferenças daquele presente no BNZ e no NF. Ele ocorre pela inibição da síntese proteica, na

forma amastigota, em concentrações onde não há o mesmo efeito com o atual tratamento disponível, e age na inibição da síntese de ácidos nucleicos, comum às três substâncias (DE CASTRO; MEIRELLES, 1990). O megazol também interfere no metabolismo do oxigênio do parasito e no sequestro da tripanotona: cofator da enzima tripanotona redutase (MAYA et al, 2003).

Figura 7: Fórmula estrutural do megazol.



Fonte: NESSLANY et al., 2004.

Neste cenário, o grupo nitro parece ser o responsável pela atividade contra o protozoário. No entanto, sugere-se que ele seja também responsável pela atividade mutagênica e carcinogênica do composto, quando ocorre biotransformação das espécies intermediárias reativas, impossibilitando seu uso clínico (WALSH et al., 1987; VIODÉ et al., 1999; POLI et al., 2002; NESSLANY et al., 2004).

Ferreira e Ferreira (1986) e Morais et al. (1998) relataram atividade mutagênica do megazol no teste *Salmonella*/microssoma (MARON; AMES, 1983), em linhagens da bactéria *Salmonella enterica* proficientes na síntese de enzimas nitroreduases, em condições aeróbicas e anaeróbicas, evidenciando a necessidade da redução enzimática na ativação do potencial mutagênico do megazol, independente da presença de enzimas do citocromo P450 (S9 mix), que agem mimetizando o ambiente enzimático das células de mamíferos.

Poli et al. (2002) investigaram o possível efeito genotóxico do megazol através de uma série de testes *in vitro* e *in vivo*. Linhagens D7 do fungo (levedura) *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com o composto não evidenciaram eventos mutagênicos ou recombinantes,

na presença ou ausência de S9 mix. Porém, houve citotoxicidade na ausência de S9 mix, sugerindo que estas enzimas desintoxicaram substâncias. Efeito citotóxico e danos no DNA foram observados nas células (leucócitos) de rato e camundongo, também.

Nesslany et al. (2004) confirmaram a atividade genotóxica do Megazol na formação de micronúcleos em células de linfoma de camundongo e na geração de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos, tanto na presença quanto na ausência de S9 mix, com um leve aumento destas ocorrências na presença destas enzimas.

O megazol pareceu ser uma boa alternativa graças a seu poder tripanocida e maior eficácia quando comparado ao tratamento disponível para a doença de Chagas. No entanto, sua atividade citotóxica e genotóxica o impede de ser candidato para um tratamento alternativo. Então, entender melhor os mecanismos de ação do megazol e de seu grupo de compostos (nitroimidazol), para auxiliar na criação de novas substâncias bioativas análogas e derivadas, mais ativas e seguras, é um possível caminho a ser tomado (POLI et al., 2002).

1.3.2 Nitrotriazóis

Os compostos heterocíclicos que contêm um anel com dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio são compostos triazóis. Eles podem integrar uma variedade de agentes medicinais, sejam eles naturais ou sintéticos, que já estão no mercado (KHARB; SHARMA; YAR, 2010). Assim como os nitroimidazóis, os nitrotriazóis têm amplo espectro de ação e suas aplicações medicinais envolvem: (i) atividade anticancerígena (AGALAVE et al., 2011); (ii) extensa atividade antiviral no tratamento do HIV, da hepatite C viral, da herpes simplex, da gripe por influenza vírus, entre outros (SAITO et al., 2003; FERREIRA et al., 2014); (iii) atividade anti-inflamatória, analgésica, anti-hipertensiva (HAFEZ; ABBAS; EL-GAZZAR, 2008); (iv) atividade antimalária (MISHRA et al., 2008); (v) entre outros (KHARB; SHARMA; YAR, 2010).

Os compostos triazóis também são promissores candidatos no desenvolvimento de novas substâncias bioativas para tratar a doença de Chagas. Uma série de substâncias contendo esse anel apresentou uma boa atividade tripanocida, inclusive com atividade superior ao benzonidazol e outros compostos imidazóis em modelos *in vitro* de células permanentes infectadas e modelo *in vivo* utilizando camundongos (PAPADOPOULOU et al., 2013, 2015).

No entanto, os heterocíclicos triazóis, assim como os imidazóis, também despertam preocupação quanto aos efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos, já que podem compartilhar do mesmo mecanismo de ação pela redução de seu grupamento nitro por enzimas nitroredutases e enzimas do citocromo P450 gerando metabólicos intermediários (PAPADOPOULOU et al., 2013, 2015). Porém, o desenvolvimento racional de novas substâncias derivadas contendo anéis triazóis (3-nitrotriazol) resultou em moléculas menos mutagênicas comparadas a esta mesma atividade dos nitroimidazóis, utilizando modelos bacterianos, concluindo-se então, que esse grupamento químico é promissor no desenvolvimento de uma alternativa ao tratamento da doença de Chagas (PAPADOPOULOU et al., 2013).

1.3.3 Novos derivados nitro-heterocíclicos

O desenvolvimento racional de novas substâncias bioativas é a aplicação de estratégias e hipóteses que buscam direcionar a ação farmacológica de uma nova molécula de acordo com o alvo biológico de interesse, ao mesmo tempo em que busca eliminar efeitos indesejáveis de sua ação, além ajudar no entendimento das interações da molécula de interesse com alvos secundários como canais iônicos, enzimas do citocromo P450 e outras proteínas (HUGGIN; SHERMAN; TIDOR, 2012).

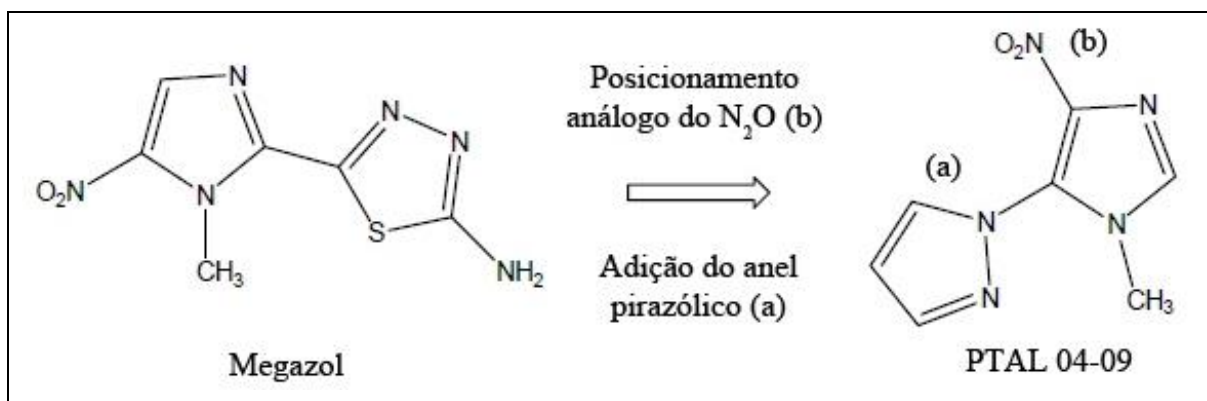
O grupo da Dr. Núbia Boechat, do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) na Fundação Oswaldo Cruz, no Departamento de Síntese Orgânica, desenvolve novos derivados a partir do megalzol, utilizando esses modelos e estratégias de desenvolvimento racional, buscando eliminar ou diminuir seu efeito citotóxico, mutagênico e genotóxico, porém preservando o efeito tripanocida (BOECHAT et al., 2001; CHAUVIÉRE et al., 2003; CARVALHO et al., 2004; CARVALHO et al., 2006; CARVALHO et al., 2007a; MELLO et al., 2013; BOECHAT et al., 2015).

Dentre as possíveis estratégias no desenvolvimento racional de novas substâncias, estudos anteriores demonstraram que a manipulação da estrutura inicial do megalzol ao substituir anéis hetero-aromáticos por um anel triazol ($C_2H_3N_3$) (CARVALHO et al., 2007b) ou um anel pirazol ($C_3H_4N_2$) (BOECHAT et al., 2001; CARVALHO et al., 2006), ou ainda na modificação da posição do radical nitroso no anel tiadiazol para o carbono 4 (BOECHAT et al., 2001; CARVALHO et al., 2006), diminuiriam o potencial citotóxico, mutagênico e

genotóxico quando comparados a molécula de origem, mantendo boa atividade tripanocida (WALSH et al., 1987; MOLINA et al., 2000; CERECETTO; GONZÁLEZ, 2002; URBINA et al., 2003a, 2003b; DUSCHAK; COUTO, 2007; CARVALHO et al., 2007a; MELLO et al., 2013).

O derivado PTAL 04-09 (1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-1*H*-pirazol) foi desenvolvido aplicando essas estratégias (Figura 8) (BOECHAT et al., 2001; CARVALHO et al., 2006) e análises confirmaram que as alterações são promissoras (MELLO et al., 2013). Por isso, ao dar continuidade a essas estratégias, atreladas a novos entendimentos e estudos que, quando aplicados podem beneficiar o desenvolvimento de novos candidatos ao tratamento da doença de Chagas, foram desenvolvidas a partir de PTAL 04-09 novas moléculas (4-nitroimidazol). Foram utilizadas metodologias de síntese para obtenções de compostos nitroimidazóis contendo anéis 1,2,3-triazóis e 1,2,4-triazóis, com diferentes radicais, manipulando a atividade tripanocida, a atividade tóxica e a solubilidade dessas novas moléculas (MELO et al., 2006; FREITAS et al., 2011; FRANÇA et al., 2014; QUARESMA, 2015).

Figura 8: Síntese do derivado PTAL 04-09.

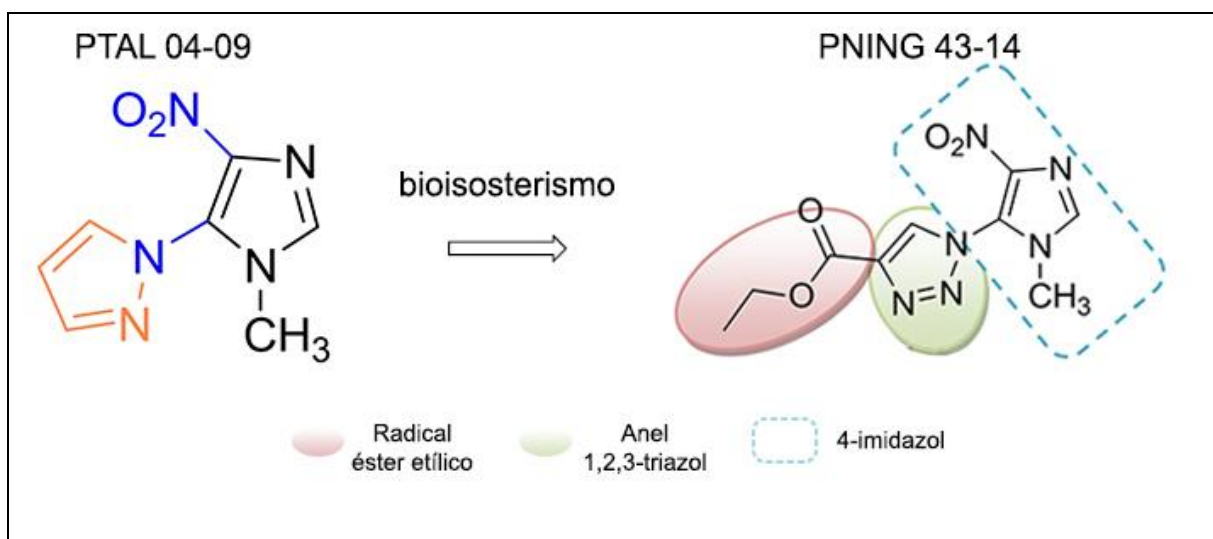


Fonte: adaptado de Carvalho et al., 2006.

1.3.3.1 PNING 43-14

A molécula PNING 43-14 é um etil-1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato, peso molecular de 266 g/mol e atividade tripanocida IC₅₀ de 45,3 μM para forma evolutiva tripomastigota de *T. cruzi*, cepa Y. A adição do radical éster etílico teve por finalidade avaliar a hidrofiliicidade na atividade biológica (Figura 9) (QUARESMA, 2015).

Figura 9: Síntese do derivado PNING 43-14.

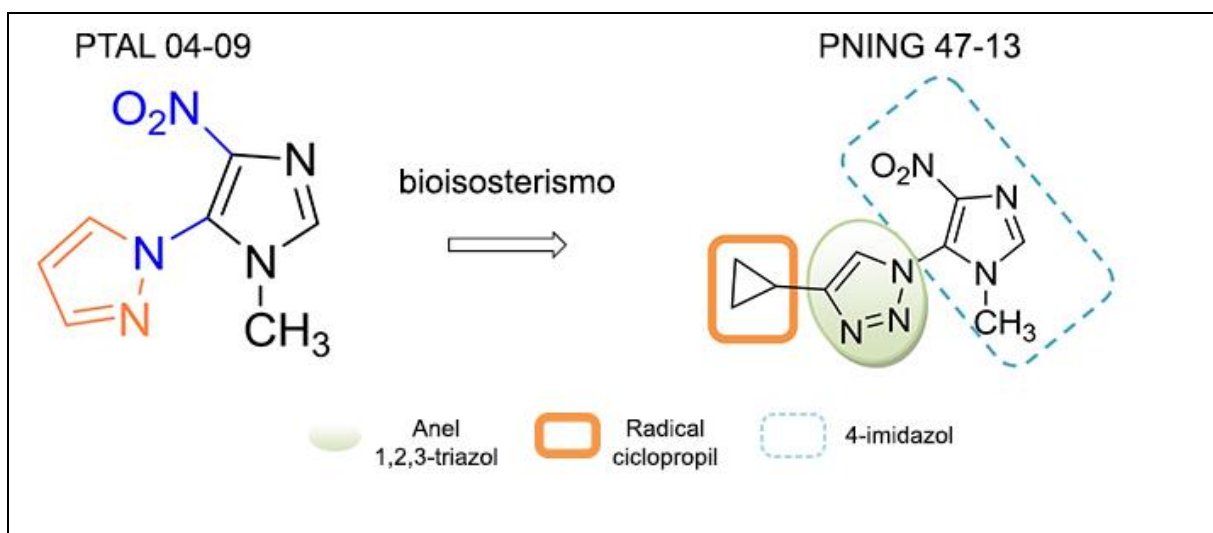


Fonte: adaptado de QUARESMA, 2015.

1.3.3.2 PNING 47-13

A molécula PNING 47-13 é um 4-ciclopropil-1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol, peso molecular de 234 g/mol e atividade tripanocida IC₅₀ de 5,4 μM para forma evolutiva tripomastigota de *T. cruzi*, cepa Y. A adição do radical ciclopropil teve por finalidade avaliar o volume espacial, a rigidez e a lipofilicidade na atividade biológica (Figura 10) (QUARESMA, 2015).

Figura 10: Síntese do derivado PNING 47-13.

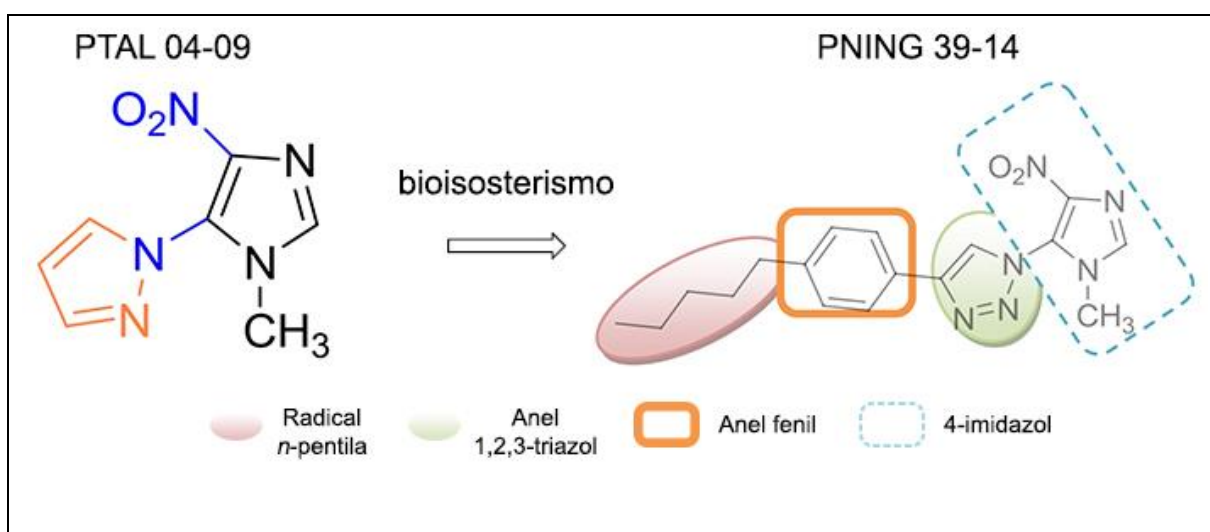


Fonte: adaptado de QUARESMA, 2015.

1.3.3.3 PNING 39-14

A molécula PNING 39-14 é um 1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-4-(4-pentilfenil)-1*H*-1,2,3-triazol, peso molecular de 285 g/mol e atividade tripanocida IC₅₀ de 12,9 µM para forma evolutiva tripomastigota de *T. cruzi*, cepa Y. A adição do radical *n*-pentila teve por finalidade avaliar a lipofilicidade na atividade biológica. Além disso, foi adicionado o anel fenil, presente no benzonidazol, que têm características hidrofóbicas e pouca liberdade conformacional (Figura 11) (QUARESMA, 2015).

Figura 11: Síntese do derivado PNING 39-14.



Fonte: adaptado de QUARESMA, 2015.

1.4 Estudos toxicológicos de novas substâncias bioativas

1.4.1 Órgãos reguladores e outras instituições

A Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) é uma organização criada em 1960 por 18 países europeus, os Estados Unidos e o Canadá a fim de promover políticas de cooperação, de desenvolvimento econômico e social nos países membros e não membros. Dentre suas diversas atribuições políticas e econômicas, a OECD

também é responsável na reunião de diretrizes pela avaliação da segurança de novas de substâncias bioativas para consumo humano. Essas diretrizes reúnem métodos científicos padronizados que são utilizados e recomendados em comum acordo por governos, indústrias e laboratórios na identificação e caracterização do possível risco de substâncias à saúde humana.

Da mesma forma, o Conselho Internacional para Harmonização (ICH), criado em 1990, é uma instituição composta por agências reguladoras e associações industriais de países europeus, asiáticos e americanos com o objetivo exclusivo de criar diretrizes de metodologias científicas para avaliar a segurança de produtos medicinais antes que estes estejam disponíveis no mercado.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), membro da ICH, é o órgão regulador nacional responsável pela promoção à proteção da saúde da população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados. Para tal, usa as orientações e diretrizes da ICH e OECD, internacionalmente reconhecidas.

1.4.2 Avaliação citotóxica, mutagênica e genotóxica de novas substâncias

1.4.2.1 Situação

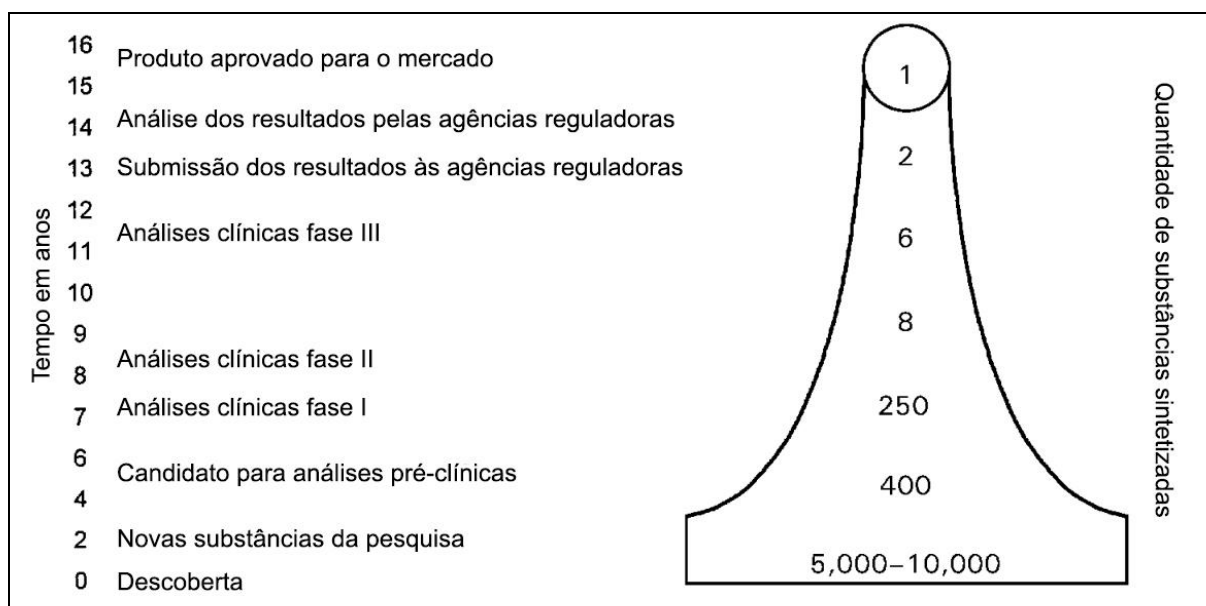
A avaliação da segurança de novas substâncias bioativas para uso humano é um pré-requisito obrigatório antes de disponibilizá-los no mercado (VINKEN; BLAAUBOER, 2017). Para tal, é necessário aplicar um conjunto de técnicas competentes recomendadas por agências reguladoras e reconhecidas internacionalmente. As técnicas são organizadas e classificadas em ensaios preliminares, pré-clínicos ou clínicos de diversas fases (I-IV), que avaliam a segurança de substâncias, e outros aspectos, por diversos critérios, entre eles: (i) as concentrações ou doses utilizadas da substância; (ii) o tempo de exposição dessas concentrações ou doses; (iii) o modelo animal, onde geralmente é exigida a utilização de no mínimo duas espécies; (iv) o ambiente a ser realizado e analisado, seja ele *in silico*, *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*; (v) os alvos moleculares direta ou indiretamente envolvidos; (vi) as vias

metabólicas do processo e os intermediários gerados; (vi) os tecidos e órgãos afetados; (vii) as reações imunológicas estimuladas ou inibidas (alergênicos); entre muitos outros critérios (ICH; 1997, 2011; OECD, 1997, 2009, 2016; ATTERWILL; WING, 2002; ANVISA, 2013).

No entanto, o desenvolvimento de novas substâncias e a avaliação toxicológica delas: (i) consomem muito tempo, podendo levar mais de dez anos para chegarem ao mercado; (ii) custam milhões de dólares, gastos no financiamento dos profissionais envolvidos, dos processos e insumos da síntese e das avaliações diversas; (iii) e é um processo muito difícil, pois de todas as moléculas sintetizadas e avaliadas, aproximadamente 90% delas são reprovadas nas análises clínicas, e por isso não conseguem chegar ao mercado (Figura 12). Atribui-se a essas reprovações questões ligadas principalmente a toxicidade das substâncias (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; THOMPSON, 2001; PATLEWICZ; FITZPATRICK, 2015).

Por esses motivos, é de extrema importância aplicar testes rápidos e baratos que avaliem o potencial citotóxico, mutagênico e genotóxico de substâncias a fim de garantir que substâncias tóxicas não sejam analisadas por todas as fases pré-clínicas e clínicas, economizando tempo e dinheiro (GUENGERICH, 2008).

Figura 12: Tempo de desenvolvimento e quantidade de substâncias com potencial terapêutico que chegam ao mercado.



Fonte: Adaptado de GAD, 2002.

1.4.2.2 Citotoxicidade

O conjunto de atividades citotóxicas mais basais pode ser definido pela habilidade de uma substância química de induzir danos genéricos às células, comprometendo mecanismos funcionais e estruturais do metabolismo celular. Esses danos podem ocorrer por alterações do funcionamento normal de canais iônicos ou receptores (GENNARI et al., 2004; HOUCK; KAVLOCK, 2008; SCHOONEN; WESTERINK; HORBACH, 2009) que contribuem modificando a integridade da bicamada fosfolipídica da célula que, por sua vez, prejudicam a troca de substâncias e o equilíbrio entre o citoplasma e o meio extracelular, a homeostase celular (ESCHER et al, 2002; VINKEN; BLAaubOR, 2017).

Essas mudanças podem desencadear outras alterações mais profundas no funcionamento normal das células como na integridade de compartimentos e organelas intracelulares, de vias de sinalização e expressão gênica no DNA nuclear e, em consequência disto, da síntese de proteínas (EISENBRAND et al., 2002; SCHOONEN; WESTERINK; HORBACH, 2009). Por fim, a cadeia respiratória da célula, que é também um dos mecanismos fisiológicos mais importantes dela, pode ser afetada pela ação citotóxica de substâncias que interferem na síntese de trifosfato de adenosina (ATP), na replicação do DNA mitocondrial e na síntese de proteínas mitocondriais (JONES et al., 2010; PESSAYRE et al, 2010). O conjunto dessas ações prejudiciais pode levar as células à morte, por apoptose ou necrose, onde esta é mais recorrente e também a mais nociva em relação àquela (BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Por esses motivos, é importante avaliar a possível atividade citotóxica de uma determinada substância (xenobiótico) de interesse terapêutico utilizando metodologias que analisem se alvos moleculares envolvidos nos processos fisiológicos das células estão funcionando normalmente, indicando se a célula está em processo de morte celular ou não (VINKEN, BLAaubOR, 2017).

O primeiro contato das substâncias com a célula ocorre pela membrana plasmática. Ao interagir com canais iônicos e receptores, pode ocorrer a indução de um aumento na permeabilidade ou desorganização da membrana fosfolipídica da célula, possibilitando o extravasamento do conteúdo citosólico para o meio externo. Dentre as inúmeras moléculas presentes no citoplasma da célula, a enzima lactato desidrogenase (LDH) catalisa a conversão do lactato a piruvato, que será utilizado no ciclo do ácido cítrico. Além disso, nesta etapa metabólica, o LDH também catalisa a oxidação e redução de moléculas de dinucleotídeo de

nicotinamida e adenina (NAD^+/NADH) (BERGMEYER, 1974; VINKEN, BLAAUBOR, 2017).

Então, pelo fato do LDH estar presente em grandes quantidades no citoplasma, caso ocorra algum dano à membrana e/ou ocorram alterações na permeabilidade desta, a probabilidade de estarem presentes grandes quantidades da enzima no meio externo é alta. Assim, é possível utilizar ensaios colorimétricos que determinem indiretamente a integridade da membrana e a atividade do LDH, através da redução do sal amarelo tetrazólio em sal vermelho formazan por um catalisador e pelo consumo de moléculas de $\text{NADH} + \text{H}^+$ na reação, que foi previamente disponibilizado pela enzima LDH no meio (BERGMEYER, 1974).

O aumento da permeabilidade da membrana celular é característica marcante de todo processo necrótico. Por isso, é possível também investigar esta via de morte celular pela entrada do iodeto de propídio (PI), um corante fluorescente que intercala ao DNA. Desta forma, a quantidade de células mortas ou em processo de morte pode ser determinada pela quantidade de fluorescência vermelha emitida pela ligação entre PI e o DNA, através de citometria de fluxo, por exemplo (VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000).

Além de ser possível analisar o potencial citotóxico de substâncias pelos danos induzidos à membrana plasmática, é possível avaliar se essas substâncias também desestabilizam o metabolismo energético das células. A mitocôndria é uma importante organela das células eucariotas, e é onde ocorrem etapas cruciais da respiração aeróbica e da geração de energia pela síntese de ATP. Esta via metabólica começa no citoplasma pela glicólise, na geração de moléculas de piruvato que ligadas à coenzima A, formam a acetil-coenzima A, necessária para o início da ciclo do ácido cítrico que ocorre na matriz da mitocôndria. Tanto a glicólise quanto o ciclo do ácido cítrico geram hidrogênios que são associados à moléculas de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e dinucleotídeo de adenina e flavina (FADH), utilizadas na cadeia respiratória que ocorre na membrana interna da mitocôndria, e que por fim, são matérias-primas para a produção de energia pela síntese de ATP (JONES et al., 2010; PESSAYRE et al., 2010).

Muitas enzimas estão envolvidas nas complexas vias metabólicas da respiração celular e devido a elas, entende-se que esses processos são muitos vulneráveis a ação de xenobióticos, podendo levar as células à morte. Por isso, o funcionamento anormal das enzimas pode ser um indicativo de um possível efeito citotóxico induzido por substâncias bioativas (VINKEN, BLAAUBOR, 2017). Dentre essas enzimas, a succinato desidrogenase participa no ciclo do ácido cítrico e também na cadeia aceptor de elétrons, ambos na

mitocôndria, e tem sua atividade determinada por testes como uma forma indireta de avaliar a atividade mitocondrial da célula, na produção de energia para seu funcionamento e, em consequência disto, para a viabilidade celular (RUTTER; WINGE; SCHIFFMAN, 2011; VINKEN, BLAUBOR, 2017).

A principal metodologia a explorar esse mecanismo é o ensaio colorimétrico de citotoxicidade MTT (MOSMANN, 1983), que determina a habilidade da célula de reduzir, pela ação da enzima succinato desidrogenase, o sal amarelo tetrazólio em um cristal de formazan azul insolúvel em água, que é solubilizado em uma etapa seguinte pelo dimetilsulfóxido (DMSO) e liberado ao meio, permitindo a determinação de sua quantidade. Outros ensaios foram desenvolvidos a partir desta ideia, eliminando etapas no processo do ensaio, e aumentando a velocidade e eficiência a qual analisa efeitos citotóxicos na célula (TOMINAGA et al., 1999; YIN et al., 2013).

Os mecanismos e ensaios descritos são competentes principalmente na análise das variáveis envolvidas na citotoxicidade induzida que levará a célula a morte por necrose. Por isso, é importante avaliar também os mecanismos envolvidos na morte celular programada e organizada: apoptose. Para tal, existem alvos moleculares que são utilizados por ensaios a fim de identificar quando uma célula inicia esse tipo de morte programada (VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000; VINKEN; BLAUBOR, 2017).

A apoptose é um mecanismo de morte celular dependente da atividade proteolítica de diversas enzimas caspase. Ela pode ser dividida em duas grandes vias apoptóticas: extrínseca e intrínseca. Esta ocorre em decorrência de tipos específicos de estresse à célula como da retirada de fatores de crescimento; por dano ao DNA através de radiação, toxinas ou radicais livres; pela privação de oxigênio, entre outras; e aquela é desencadeada principalmente pela ligação de fatores específicos a receptores de membrana que sinalizem o início da apoptose. Ambos os caminhos estimulam a ativação de uma série de enzimas que levará a clivagem de proteínas, a fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos, entre outros (VINKEN, BLAUBOR, 2017).

Nos estágios iniciais da apoptose, ocorrem algumas mudanças na membrana plasmática (PYTELA; PIERSCHBACCHER; RUOSLAHTI, 1985; SAVILL et al., 1993). Um dos alvos moleculares utilizados na identificação do processo apoptótico que participa dessas mudanças é a proteína fosfatidilserina. Ela transloca da face interior da bicamada fosfolipídica da célula para a face exterior, enquanto a membrana plasmática ainda está íntegra nesse estágio inicial (FADOK et al., 1992). A anexina V (RAYNAL; POLLARD, 1994) é uma proteína dependente de cálcio (Ca^{2+}) que tem grande afinidade de ligação a

fosfolipídios, como a fosfatidilserina. Desta forma, quando a anexina V, complexada a um fluoróforo (por exemplo: isotiocianato de fluoresceína - FITC), se liga a fosfatidilserina, libera o fluoróforo que passa a emitir fluorescência e assim, é possível identificar, através de citometria de fluxo, se a célula está em apoptose, que pode ter sido induzida por uma substância de interesse terapêutico. Além disso, também é possível utilizar o complexo anexina V-FITC em conjunto com o PI para realizar a análise conjunta de células que estejam no estágio inicial ou final da apoptose, ou em necrose (VERMES et al., 1995).

Esses e outros ensaios *in vitro*, além dos descritos, que avaliam a indução de danos genéricos às células são importantes ferramentas no estudo toxicológico inicial de novas substâncias, e a aplicação conjunta deles viabilizam a economia de tempo e dinheiro (EISENBRAND et al., 2002). No entanto, a ação mutagênica das substâncias também deve ser avaliada, principalmente pela dificuldade de determinar os fatores envolvidos na carcinogênese, que muitas vezes são decorrentes de uma mistura complexa de fatores ambientais e compostos químicos aos quais humanos estão expostos diariamente, sejam eles naturais ou não (AMES, 1979; GOODSON et al., 2015; VINKEN, BLAAUBOR, 2017).

1.4.2.3 Genotoxicidade

Os agentes naturais ou sintéticos que atuam direta ou indiretamente induzindo mutações pontuais nos nucleotídeos, adutos, quebra das fitas do DNA, modificando a estrutura ou distribuição numérica normal dos cromossomos (aberrações cromossômicas), são considerados agentes com atividade genotóxica (DOLL, 1977; VARGAS, 1993; SURH, 1999; GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; GAD, 2002).

A exposição a esses agentes durante anos tem ligação direta com o desenvolvimento do câncer (carcinogênese) mais tarde na vida de um indivíduo. A carcinogênese pode ocorrer pela alteração e perda de controle dos processos de regulação do ciclo celular, de sobrevivência, morte programada e proliferação celular, resultando em mudanças profundas na homeostase celular, que se transforma e se multiplica indefinidamente em alta frequência. Dessa forma, ocorre a formação da massa tumoral em um tecido ou órgão exposto por essas variáveis (EISENBRAND et al., 2002; GAD, 2002)

Os testes genotóxicos, *in vitro* ou *in vivo*, são amplamente utilizados e eficientes para prever o possível efeito carcinogênico de uma substância química de interesse terapêutico,

possibilitando o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos e ajudando no desenvolvimento de novas moléculas mais seguras (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; OECD, 2016).

Dentre os testes disponíveis, os ensaios bacterianos de avaliação mutagênica têm desempenhado um importante papel na identificação de agentes mutagênicos pela simplicidade, rapidez, e baixo custo; pela reconhecida capacidade de detectar um amplo leque de componentes mutagênicos; e principalmente porque existe uma grande associação, de aproximadamente 80%, entre um agente ser mutagênico para bactéria e carcinogênico para mamíferos (MOHN, 1981; PURCHASE, 1982; MARON; AMES, 1983; MORTHELMANS; ZEIGER, 2000).

As mutações pontuais são pontos de partida para muitas doenças genéticas em humanos por estarem envolvidas na formação tumoral, principalmente quando ocorrem em oncogenes e genes de supressão tumoral. Elas podem ocorrer substituindo, adicionando ou deletando pares de bases de nucleotídeos no DNA. Desta forma, a leitura dos códons do DNA pode levar a uma parada antecipada da transcrição do código genético ou a transcrição de um aminoácido diferente que, conseqüentemente, traduz um polipeptídeo com propriedades diferentes àquelas originalmente desejadas. A consequência final dessa cascata de eventos é a mudança funcional de vias metabólicas e processos fisiológicos da célula (OECD, 1997; GAD, 2002)

O teste da mutação reversa bacteriana (teste *Salmonella*/microsoma ou de Ames) é capaz de detectar especificamente este tipo de mutação. Ele utiliza linhagens da bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (*S. enterica*) deficientes na síntese do aminoácido histidina, necessário para a sobrevivência das células e formação de colônias. Quando a bactéria está em contato com uma substância mutagênica, ocorre a reversão da deficiência em proficiência na síntese de histidina permitindo sua sobrevivência. A mutação responsável pela deficiência desta síntese pode ser induzida em diversos *loci* do gene responsável, através da substituição, adição ou deleção de pares de bases. Desta forma, estão disponíveis inúmeras linhagens que em contato com uma substância mutagênica, permitem evidenciar o mecanismo de ação induzido e outros parâmetros (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Em uma avaliação inicial, é recomendada a utilização das linhagens de *S. enterica* TA97, TA98, TA100 e TA102, que são capazes de avaliar diferentes classes de substâncias químicas quanto à mutagenicidade e seus mecanismos de ação. As linhagens TA1535 ou TA104 podem ser utilizadas pela capacidade de detectar determinados agentes mutagênicos

que a TA100 e a TA102, respectivamente, não detectam (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). No entanto, modelos bacterianos diferem das células eucariotas de mamíferos, principalmente no metabolismo de xenobióticos por enzimas do citocromo P450 (CYP450). Por isso, existe a necessidade de utilizar uma fonte de metabolização exógena para mimetizar ao máximo o ambiente metabólico *in vivo* das células de mamíferos. Mas essa alternativa é limitada pela baixa variedade de enzimas CYP450 disponíveis no ensaio (OECD, 1997).

Outra desvantagem metabólica desses modelos tem relação com a mutagenicidade de nitrocompostos que pode não ser evidenciada ou ocorrem de forma branda. As linhagens modificadas do teste expressam baixos níveis de enzimas nitroredutases em relação à linhagem de *S. enterica* de origem (LT2), devido à deleção de um importante gene responsável pela síntese destas enzimas. Por isso, é de interesse aproveitar, caso exista, o conhecimento prévio sobre o agente teste como a classe das substâncias, que vai sugerir o possível mecanismo de ação mutagênica, possibilitando determinar as condições do experimento, principalmente na utilização de linhagens alternativas às recomendadas para uso inicial que sejam mais sensíveis a ação de nitrocompostos (MARON; AMES, 1983; WATANABE; ISHIDATE; NOHMI, 1989, 1990; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; PORWOLLIK et al., 2001).

Os testes bacterianos, principalmente o teste de Ames, são reconhecidos pela comunidade científica e agências internacionais regulatórias, e utilizados na avaliação inicial para determinar a mutagenicidade de agentes químicos (OECD, 1997; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; ICH, 2011). Porém, outras atividades genotóxicas também devem ser avaliadas em células de mamífero por metodologias *in vitro* e/ou *in vivo* recomendadas (ICH, 2011; OECD, 2016).

Dentre as metodologias disponíveis, o teste do micronúcleo é um ensaio para avaliar a atividade genotóxica (atividade aneugênica e clastogênica) de substâncias que são responsáveis pela formação de micronúcleos no citoplasma das células em intérfase. O micronúcleo é um dano ao DNA que foi transmitido às células filhas, que se originou de fragmentos de cromossomos acêntricos ou de todo cromossomo que foram incapazes de migrarem para os polos na anáfase da divisão celular (EISENBRAND et al., 2002; OECD, 2016).

O teste do micronúcleo apresenta vantagens interessantes. A aplicação do teste é simples e rápida, e sua robustez é uma grande vantagem por permitir a utilização de diversos modelos biológicos, sejam eles *in vitro* ou *in vivo*, de cultura de célula primária ou

permanente, também provenientes de humanos (GAD, 2002; EISENBRAND et al., 2002; OECD, 2016).

A OECD (2015) e a ICH (2011) preconizam outros testes competentes na análise da atividade genotóxica como: (i) a avaliação *in vitro* da mutagenicidade nos genes *hprt* ou *xprt*, em cultura de células de mamíferos, que analisa as mutações que foram induzidas e interromperam a função dos respectivos genes, seja por mutações pontuais, pequenas deleções e adições (*hprt*), ou por longas deleções, recombinação gênica, que levam à perda de heterozigosidade (*xprt*); (ii) a avaliação *in vitro* da mutagenicidade no gene timidina quinase, em cultura de células de mamíferos, induzidas por mutações pontuais, pequenas e longas deleções, recombinação e rearranjo cromossômico, que levam à perda de heterozigosidade; (iii) avaliação *in vitro* ou *in vivo* da indução de aberrações cromossômicas ou da cromátide em cultura de células de mamífero; entre outros.

Levando-se em consideração a relevância dos testes disponíveis, a OECD propõe, além da aplicação dos ensaios de citotoxicidade para triagem e determinação de concentrações seguras, caso seja possível, uma bateria de metodologias a serem aplicadas no estudo da atividade genotóxica a fim de angariar o máximo de informação possível acerca dos mecanismos de ação de uma determinada molécula. Ou seja, não se deve aplicar os ensaios assim como os resultados não devem ser interpretados isoladamente. Resultados de um ensaio devem ser analisados em conjunto com os demais ensaios utilizados, e variáveis como concentração, tempo de exposição, linhagem celular, entre outras, também devem ser interpretados corretamente em conjunto. Esses cuidados são necessários, pois o resultado positivo a um teste não determina rigorosamente se uma substância é ou não é genotóxica (OECD, 2015).

1.4.3 Genes do citocromo P450 no metabolismo de xenobióticos

1.4.3.1 Biologia

Os genes do citocromo P450 (CYP) são um conjunto de genes que expressam diversas famílias de enzimas que são responsáveis por mais de 70% do metabolismo de xenobióticos (moléculas de origem externa), além de substâncias endógenas. Além disso, os

genes CYP também participam de processos fisiológicos como no metabolismo do colesterol e hormônios esteroides, carcinógenos, de ácidos graxos, de vitaminas e de eicosanoides. Eles são expressos praticamente em todo tecido e órgão no corpo humano, mas em maior escala no fígado, e em menor escala, mas com relevante importância, no epitélio intestinal (GUENGERICH, 2008; LYNCH; PRICE, 2007; ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2016).

As enzimas do CYP, localizadas no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias das células, catalisam inúmeras reações, mas principalmente reações de oxidação, redução e hidrólise, onde o objetivo é eliminar substâncias exógenas hidrofóbicas que são metabolizadas em substâncias mais hidrofílicas, facilitando a excreção. No entanto, esses processos metabólicos têm relevante importância no desenvolvimento de novas substâncias bioativas, pois eles podem modular a ativação ou inibição do efeito terapêutico da substância, a biodisponibilidade da substância para os alvos pretendidos; a ação tóxica direta ou indireta da substância primária ou de metabólitos intermediários gerados; a interação droga-droga pela indução ou inibição de genes CYP que podem estar envolvidos na ação terapêutica de outras substâncias administradas. Desta forma, é importante entender as reações químicas atuantes para garantir o efeito terapêutico e evitar interações indesejadas da substância de interesse (GUENGERICH, 2006, 2008; ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2016).

Ademais, os genes do citocromo P450 têm atividade fisiológica variável devido a fatores ambientais ou genéticos que podem ser constantes como sexo, polimorfismos dos genes, ou dinâmicos como idade, doenças, exposição a administração constante de certos medicamentos, alimentação, que devem ser levados em consideração na atividade de uma determinada molécula. Em decorrência disto, esses fatores, principalmente os genéticos (polimorfismo), em uma mesma população podem modular em mais de 100 vezes a expressão de determinados genes CYP entre indivíduos, desempenhando importante variável no lançamento de um novo fármaco ao mercado que deve ser seguro e apresentar atividade terapêutica adequada para todo indivíduo que necessite (GUENGERICH, 2006; ZANGER; SCHWAB, 2013).

Existem 57 genes e 58 pseudogenes do citocromo P450, divididos em famílias e subfamílias, onde aproximadamente 15 genes são implicados na metabolização de xenobióticos. Dessa parcela menor de genes CYP, a subfamília CYP3A4 é a que tem maior abundância de enzimas expressas e é responsável por aproximadamente 50% da metabolização de xenobióticos em comparações aos demais genes, seguido das subfamílias CYP1A1, 1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 e 2E1, entre outros. É importante ressaltar que a

relevância de determinados genes na metabolização de substâncias não está necessariamente relacionada a quantidade de enzimas presentes, mas sim na quantidade de moléculas as quais podem interagir. Além disso, é comum que mais de um gene do CYP esteja envolvido na metabolização de um único substrato (GUENGERICH, 2006, 2008; PELKONEN et al., 2008; ZANGER et al., 2014; ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2016).

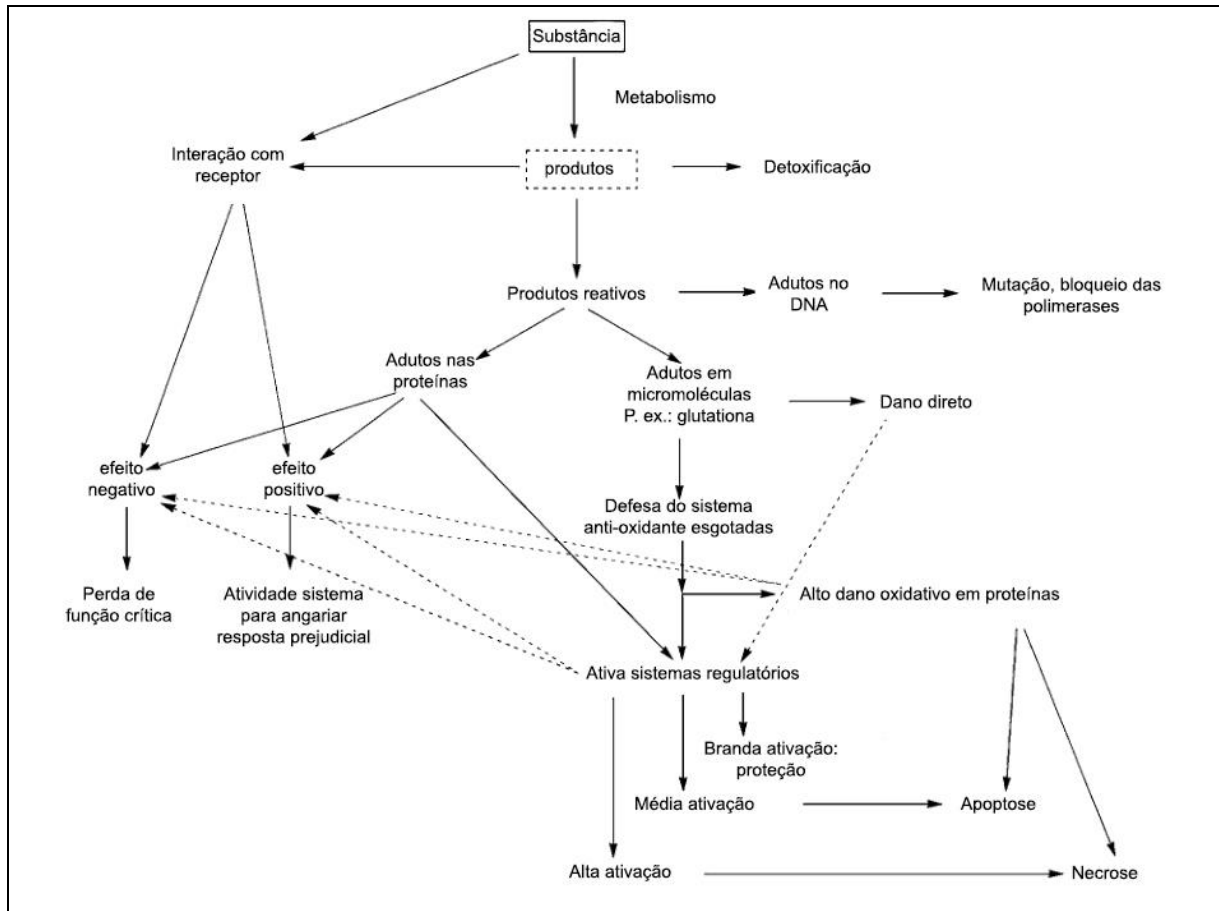
Normalmente, espera-se que o sistema de metabolização de xenobióticos por enzimas do citocromo P450 ocorra a fim de desintoxicar e desativar a ação de substâncias que possam causar algum tipo de dano às células ou interferir em processos fisiológicos, facilitando a rápida eliminação delas do corpo pelo aumento da hidrofobicidade de determinado substrato. No entanto, devido a alta complexidade dos mecanismos de metabolização, estes são suscetíveis a ação de diversos fatores que interfiram na expressão de genes e na atividade das enzimas. Além disso, podem estar expostos a substratos que quando metabolizados, exercem determinada atividade (bioativação), desencadeando uma série de reações de interesse (pró-fármacos) ou danosas às células (carcinógenos) (GUENGERICH, 2006; PELKONEN et al., 2008; RENDIC; GUENGERICH, 2012).

1.4.3.2 Bioativação de xenobióticos

A atividade tóxica ou adversa decorrente do metabolismo de xenobióticos pode ser entendida e analisada: (i) na ação de determinada substância nos alvos moleculares pretendidos ou não pretendidos; (ii) na hipersensibilidade e nas reações imunológicas (autoimune) desencadeadas; (iii) nos efeitos idiossincráticos; (iv) nos fatores que modulam a biodisponibilidade da substância na corrente sanguínea; (v) na indução ou inibição da expressão de genes de metabolização; (vi) e na bioativação de substâncias que causem algum tipo de dano pela formação de produtos eletrofílicos reativos (Figura 13) (GUENGERICH, 2006; WARIS; AHSAN, 2006).

Em relação a bioativação de substâncias, é possível ocorrer a geração de produtos eletrofílicos, sejam eles metabólitos reativos que se liguem de forma covalente a proteínas, DNA e outras macromoléculas formando adutos, ou espécies reativas de oxigênio (ERO) causando danos às células e interferindo nos ciclos celulares. Todos esses fatores provenientes das reação de metabolização por CYP e outras enzimas podem contribuir com a gênese do câncer (GUENGERICH, 2006; LIOU; STORZ, 2010).

Figura 13: Possíveis eventos biológicos relevantes na toxicidade química.



Fonte: adaptado de GUENGERICH, 2008.

A relação entre a metabolização de substâncias (prócarcinógenos) e os processos carcinogênicos gerados já é bem conhecida. Isto porque muitos compostos aos quais os seres vivos estão expostos diariamente, provenientes tanto de fontes naturais quanto de fontes antropogênicas, já foram identificados. Uma parte significativa deles são compostos com cadeias heterocíclicas aromáticas, contendo grupamentos com nitrogênio (RENDIC; GUENGERICH, 2012).

Dentre os compostos carcinogênicos identificados, as *N*-nitrosaminas são um grupo de substâncias resultantes da metabolização de nitratos e nitritos encontrados naturalmente em vegetais e frutas, mas também por serem utilizados como aditivos em carnes processadas, geram uma fonte antropogênica importante dessas substâncias. Elas estão envolvidas na etiologia dos cânceres de fígado, pulmão e diversos órgãos e tecidos do sistema digestório, e sua metabolização ocorre pela subfamília CYP2E1 e CYP2A6, principalmente (YAMAZAKI, H. et al, 1992; RENDIC; GUENGERICH, 2012).

As aminas aromáticas são importantes intermediários químicos industriais, e também são empregados na fabricação de plásticos e corantes. As aminas heterocíclicas aromáticas são produzidas principalmente no cozimento (grelha) de carnes, mas também podem ser encontrados em produtos alcóolicos (cerveja e vinho), na fumaça do cigarro e em drogas arilaminas. Essas duas classes de substâncias são majoritariamente metabolizadas, em uma primeira etapa, pela família CYP1A, seguido da metabolização por enzimas *N*-acetiltransferases (NAT), formando inúmeros metabólitos como ésteres, que podem ser metabolizados em outros eletrofílicos reativos, todos com alta atividade genotóxica para bactérias e mamíferos (WANG; GUENGERICH, 2013).

Compostos conazois como os imidazois e os triazois tem aplicação diversa, como antifúngicos na agricultura, contaminando solos e rios, e na medicina, com drogas comercialmente disponíveis. Devido ao amplo espectro de ação desse tipo de compostos, apresentam também boa atividade antiparasitária. No entanto, é relatado que algumas substâncias dessa classe podem induzir efeitos carcinogênicos em animais, metabolizadas por CYP1A e CYP3A, interferindo na biossíntese do colesterol e conseqüentemente na síntese de hormônios, rotas relacionadas a gênese do câncer de próstata e mama (LIN; CHOU; CHEN, 2014).

A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) também está envolvida nos processos carcinogênicos, pois facilitam a mutagênese, a promoção e progressão do câncer. A geração de espécies reativas de oxigênio ocorre nos ciclos catalíticos das enzimas quando as espécies reativas escapam das reações, como ocorre notavelmente nos ciclos catalíticos das enzimas do CYP2E1 e 3A4, aos quais ânions superóxido e peróxidos de hidrogênio, entre outros, são gerados em tamanha quantidade que o sistema de defesa antioxidante não consegue neutralizar (LIOU; STORZ, 2010; HRYCAY; BANDIERA, 2015).

Essas vias metabólicas e seus efeitos são importantes, e devem ser analisadas nos estudos toxicológicos, pois mais de 60% da ativação de prócarcinógenos podem ser realizadas pelas enzimas CYP, onde as famílias 1A, 2A, 2B, 2E, 3A e 4A estão envolvidas em mais de 70% desse processo, além da participação delas na geração de espécies reativas de oxigênio (GUENGERICH, 2008; RENDIC; GUENGERICH, 2012; HRYCAY; BANDIERA, 2015).

1.4.3.3 Interação medicamentosa

Outros fatores a serem considerados na análise toxicológica de novas substâncias relacionada ao metabolismo de xenobióticos é a capacidade delas inibirem ou induzirem os genes do citocromo P450, que por sua vez podem impactar na dinâmica do tratamento por medicamentos utilizados por pacientes portadores do *Trypanosoma cruzi* e outras doenças. As doses prescritas, os efeitos adversos, a atividade terapêutica, a biodisponibilidade da droga no plasma e nos tecidos que podem durar até meses, e a metabolização e excreção de xenobióticos são alguns dos exemplos resultantes da indução ou inibição de genes CYP por substâncias administradas concomitantemente a um tratamento. Além disso, a dieta, a idade, as doenças pré-existentes, o sexo e o perfil genético (polimorfismo) de um determinado indivíduo também são implicados nessa dinâmica e devem ser levados em consideração (OGU; MAXA, 2000; GUENGERICH, 2008; PELKONEN et al., 2008).

A indução da expressão de genes CYP é modulada pela ligação de substâncias a receptores intracelulares que gerem fatores de transcrição desses genes, aumentando a síntese de enzimas. Essa indução pode resultar na aceleração do metabolismo e excreção de um fármaco administrado, ou seja, a depender da substância, o efeito terapêutico desejado pode não ser induzido de forma adequada. Além disso, eletrófilos reativos podem ser gerados em grandes quantidades, expondo os tecidos e órgãos a ação deles, e a efeitos tóxicos (BRODIE et al., 2013).

No entanto, a indução é um fenômeno gradual que depende de algumas variáveis para que seus efeitos secundários sejam observados. A dose administrada do indutor (dose-dependência), a meia vida da substância indutora, a meia vida da enzima induzida e a cinética enzimática, ou seja, a quantidade de substrato que a enzima pode biotransformar, modulam o tempo de indução e dos efeitos decorrentes do fenômeno (OGU; MAXA, 2000; BRODIE et al., 2013).

A inibição da expressão de genes CYP, porém, além de ser a causa mais comum de interação medicamentosa responsável pela retirada de diversos medicamentos do mercado devido aos efeitos gerados, ocorre imediatamente após a exposição. Ela pode ser reversível ou irreversível, e a dinâmica metabólica da inibição tem relação com a competição dos sítios de ligação entre as substâncias e os receptores que induzem os fatores de transcrição de genes. Como a expressão de enzimas que possam metabolizar determinado medicamento está inibida, há um acúmulo do medicamento no plasma e nos tecidos, gerando efeitos tóxicos.

Além disso, um pró-fármaco não metabolizado, não irá exercer sua atividade terapêutica (PELKONEN et al., 2008).

Dentre os genes do citocromo P450, a família CYP3A é a mais suscetível a ação de indutores e inibidores, pois é a família de enzimas responsável por uma grande fatia do metabolismo de xenobióticos, como já dito anteriormente. Por exemplo, as enzimas CYP3A são responsáveis pela metabolização de diversas estatinas, grupo de medicamentos mais prescrito no mundo, utilizados no controle do metabolismo do colesterol para prevenção de doenças cardiovasculares. A administração do indutor de CYP3A, rifampicina, utilizado no tratamento da tuberculose, pode aumentar a metabolização das estatinas, inibindo seu efeito terapêutico. No entanto, a inibição de CYP3A, que pode ocorrer na administração de antifúngicos e antiparasitários, a exemplo dos compostos azois, pode levar a indução de sérios efeitos adversos e tóxicos gerados pelo aumento da biodisponibilidade da estatina no organismo do indivíduo (ZHANG et al, 2002; KRAU, 2013; RAMKUMAR; RAGHUNATH; RAGHUNATH, 2016).

Pelos motivos descritos, o desenvolvimento de uma nova substância bioativa, com o objetivo de melhorar ou aumentar as opções farmacológicas no tratamento de doenças, deve utilizar o máximo de conhecimento disponível, e aplicar as técnicas propostas e regulamentadas para garantir que a disponibilidade de novos medicamentos aos indivíduos seja sempre a melhor opção possível, com grandes benefícios e menores custos.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Analisar a atividade tripanocida, citotóxica e genotóxica, e investigar os genes do citocromo P450 expressos ou inibidos, no tratamento *in vitro* de cultura de células, com novos derivados nitro-heterocíclicos.

2.2 Específicos

No tratamento com os novos derivados nitro-heterocíclicos, analisar:

- a atividade tripanocida em células de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, na forma evolutiva amastigota (axênica), pelo ensaio colorimétrico MTT;
- a atividade tripanocida de macrófagos de camundongo *Swiss Webster* infectados com células de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, na forma evolutiva amastigota;
- a atividade citotóxica pela interferência no metabolismo mitocondrial, por teste colorimétrico WST-1, e na integridade da membrana plasmática, por teste colorimétrico LDH, de cultura de células de linhagens permanentes de hepatocarcinoma humano HepG2 e macrófagos RAW 264,7;
- a atividade citotóxica pela indução de apoptose ou necrose de cultura de células de linhagem permanente de macrófagos RAW 264,7, por citometria de fluxo;
- a atividade genotóxica, pela indução de mutações puntiformes, pelo teste *Salmonella*/microsoma;
- a atividade genotóxica pela indução da formação de células micronucleadas, pelo ensaio do micronúcleo, em cultura de células de linhagens permanentes de hepatocarcinoma humano HepG2 e macrófagos RAW 264,7;

- a indução ou inibição da expressão de genes do citocromo P450 3A4, 1A2, 2B6 e 2E1, em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2.

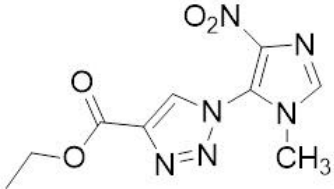
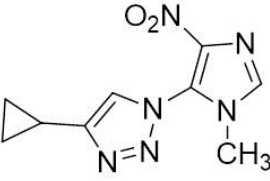
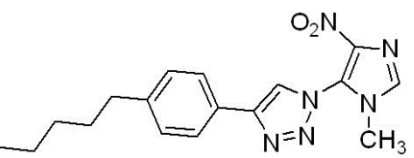
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo e diluição dos derivados nitro-heterocíclicos

Os derivados nitro-heterocíclicos foram sintetizados pelo grupo da Dr. Núbia Boechat, do Departamento de Síntese Orgânica, no Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos), da Fundação Oswaldo Cruz. As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO).

São eles: PNING 47-13 (4-ciclopropil-1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol), PNING 43-14 (etil-1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato) e PNING 39-14 (1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-4-(4-pentilfenil)-1*H*-1,2,3-triazol). As informações sobre a fórmula estrutural e a atividade tripanocida (IC_{50}) em células de *T. cruzi*, cepa Y, forma evolutiva tripomastigota, dos derivados estão reunidas no quadro 1. A equivalência entre a concentração inicial, massa final e massa molar inicial dos derivados nitro-heterocíclicos utilizada nos diversos experimentos está na tabela 1.

Quadro 1: Fórmula estrutural, peso molecular e atividade tripanocida dos derivados nitro-heterocíclicos.

Derivado	Fórmula estrutural	Peso Molecular	IC_{50} (μM)
PNING 43-14		266	$45,3 \pm 4,0$
PNING 47-13		234	$5,4 \pm 0,63$
PNING 39-14		285	$12,9 \pm 1,2$

Fonte: QUARESMA, 2015.

Tabela 1: Equivalência entre a concentração inicial, massa final e massa molar inicial dos derivados nitro-heterocíclicos utilizada nos diversos experimentos.

Derivado	Concentração Inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Massa final ($\mu\text{g/poço}$)	Massa molar inicial (μM)
PNING 43-14	1,0	0,1	3,76
	2,5	0,25	9,4
	5,0	0,5	18,8
	10	1,0	37,6
	25	2,5	94
	50	5,0	188
	100	10	376
	500	50	1880
	1000	100	3760
PNING 47-13	1,0	0,1	4,27
	2,5	0,25	10,6
	5,0	0,5	21,3
	10	1,0	42,7
	25	2,5	106
	50	5,0	213
	100	10	427
	500	50	2135
	1000	100	4270
PNING 39-14	1,0	0,1	3,5
	2,5	0,25	8,75
	5,0	0,5	17,5
	10	1,0	35
	15	1,5	52
	20	2,0	70
	25	2,5	87,5
	50	5,0	175
	100	10	350
	500	50	1750
1000	100	3500	

3.2 Análise da atividade tripanocida

3.2.1 Obtenção de massa parasitária

Camundongos machos, linhagem *Swiss Webster*, peso entre 20 e 24 g, 21 dias de idade, foram infectados com $1,0 \times 10^5$ de tripomastigota, cepa Y, via intraperitoneal. Após 48 h de infecção, os camundongos foram imunossuprimidos pela administração de ciclofosfamida 200 mg/kg, via intraperitoneal.

No sétimo dia de infecção, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e foi realizada a punção cardíaca utilizando seringa de 3 mL contendo citrato de sódio 3,8%. O sangue puncionado foi acondicionado e homogeneizado em tubos de rosca fina de 5 mL.

Para obtenção da massa parasitária, os tubos de sangue foram centrifugados a 251 x g, a 25°C, por 22 min. Ao final, os tubos centrifugados permaneceram em estufa a 37°C por 20 min. Em fluxo laminar vertical estéril, até 11 mL de sobrenadante (plasma) foram retirados e acondicionados em tubos cônicos estéreis de 15 mL. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2465 x g, a 24°C, por 15 min. O sobrenadante foi retirado e no tubo permaneceram os parasitos (sedimento), hemácias e plaquetas. Em seguida, 4 mL de meio DMEM (17,3 g meio Eagle modificado Dulbecco; 3,7 g NaHCO₃; pH 7,4; q.s.p. 1 L de água ultrapura) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) foram adicionados próximos ao sedimento celular a fim de formar uma suspensão (parasitos) de característica esbranquiçada que rapidamente foi dispersada no meio. O meio contendo os parasitos foi transferido para um novo tubo estéril cônico de 15 mL e os parasitos foram quantificados com câmara de Neubauer (HOARE, 1972; MEIRELLES; ARAUJO-JORGE; DE SOUZA, 1982; KLEIN, 2004).

3.2.1.1 Infeção da cultura de células Vero

Para obtenção da cultura axênica de tripomastigotas, células Vero (rim de *Cercopithecus aethiops*) foram cultivadas em meio RPMI (2,0 g NaHCO₃; penicilina 70 µg/mL; estreptomicina 100 µg/mL; pH 7,4; q.s.p. 1 L de água ultrapura) suplementado com

10% de SFB, e infectadas com tripomastigotas sanguíneo da obtenção parasitária, e a garrafa de cultura foi mantida em estufa de CO₂ 5%, a 37 °C, por 24 h. Após esse período de tempo, o sobrenadante foi retirado, e foi adicionado PBS (0,2 g KCl; 0,24 g KH₂PO₄; 8,0 g NaCl; 1,44 g Na₂HPO₄; pH 7,4, q.s.p. 1 L de água ultrapura), para lavagem. A cultura de células infectadas foi mantida com meio RPMI suplementado com 10% de SFB, em estufa de CO₂ 5%, a 37 °C, por cinco dias.

A partir do 5º dia de cultura, os tripomastigotas de cultura foram coletados no sobrenadante e separados por centrifugação diferencial (800 x g, por 10 min), seguido de descanso por 1 h em estufa CO₂ 5%, a 37 °C, tempo suficiente para separar conteúdo indesejado (sedimento) dos tripomastigotas presentes no sobrenadante.

3.2.1.2 Amastigogênese e análise da viabilidade celular dos amastigotas axênicas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y

Tripomastigotas de cultura foram incubados em garrafa de cultura de célula na concentração de 5 x 10⁶ parasitos por mL de meio DMEM, pH 5,0, ajustado com MES 1M (ácido 4-mortolineo-etano-sulfônico), e mantidos em estufa de CO₂ 5%, a 37 °C, por 24 h. Em seguida, o meio com os amastigotas axênicas foi centrifugado (3000 x g, por 7 min), e as células foram suspensas em DMEM (sem fenol red), pH 5,0, ajustado com MES 1M e suplementado com 10% de SFB (HERNÁNDEZ-OSÓRIO et al., 2010).

Para a avaliação da atividade tripanocida, em placas de 96 poços foram adicionados 200 µL de meio de cultura DMEM (sem fenol red) suplementado com MES 1M e 10% de SFB, contendo 1,0 x 10⁷ de amastigotas axênica, e as concentrações dos derivados nitro-heterocíclicos, que permaneceram em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por 24 h.

Após esse período, adicionou-se 25 µL em cada poço da solução MTT 5 mg/mL, e a placa foi incubada por 18 h em estufa de CO₂ 5%, a 37°C. O reagente MTT, então, foi reduzido em cristal de formazan pelas células viáveis, o qual foi solubilizado pela adição de 75 µL de DMSO, para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm (MOSMANN, 1983).

3.2.2 Análise da atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y

Camundongos *Swiss Webster* foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as cavidades peritoneais foram lavadas com meio de cultura DMEM gelado sem soro, com seringa de 5 mL, para obtenção de macrófagos peritoneais.

Em placa para cultura de células de 24 poços contendo lamínulas circulares estéreis de 13 cm, adicionou-se em cada poço 500 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB contendo a concentração final de $1,0 \times 10^6$ células/mL de macrófagos peritoneais. A placa permaneceu em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por 24 h.

Após este período, o meio de cultura dos poços foi retirado e foram adicionados 500 µL de meio de cultura DMEM contendo a concentração final $1,0 \times 10^7$ células de *T. cruzi* forma evolutiva tripomastigota por mL. A placa permaneceu em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por 24 h, onde ocorreu a infecção dos macrófagos e a amastigogênese.

Para o tratamento das células infectadas, foi retirado o meio de cultura dos poços e adicionado PBS, pH 7,4, para lavagem. Em seguida, foram adicionados 500 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB contendo as concentrações dos derivados nitro-heterocíclicos, que permaneceram em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por 48 h.

Ao final do tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado dos poços e adicionado PBS, pH 7,4, para lavagem. Então, foram adicionados 100 µL de metanol gelado 100% (CAS# 67-56-1), por 15 min, para fixação das células, seguido da lavagem dos poços com água destilada para remoção de resquícios de metanol.

Para coloração, foi utilizado o panótico rápido LB, baseado no princípio de coloração hematológico estabelecido por Romanowsky. As lamínulas circulares contendo as células infectadas e tratadas foram coradas por imersão sequencial de 5 s em solução de triarilmetano 0,1 %, solução de xanteno 0,1% e solução de tiazina 0,1%. Em seguida, as lamínulas foram lavadas por imersão em água destilada e secadas à temperatura ambiente.

Por fim, as lamínulas foram analisadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x) pela contagem de 100 macrófagos, verificando quantos deles estavam infectados e quantas células parasitárias estavam infectando cada macrófago (MEIRA et al., 2016).

3.3 Cultura de células de linhagens permanentes

A cultura de células de macrófagos RAW 264,7 cresceu em frasco para cultura de células com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, em estufa de CO₂ 5% a 37°C, até atingir a confluência necessária (aproximadamente 95% de confluência). Após o crescimento, as células aderidas na base do frasco foram removidas por desagregação mecânica através de espátula estéril (*scraper*) e centrifugadas por 3 min a 400 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi suspenso em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e quantificado em câmara de Neubauer para utilização nos testes propostos.

A cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2 cresceu em frasco para cultura de células com meio de cultura MEM (11,875 g meio mínimo essencial Eagle; 2,2 g NaHCO₃; 1,1 g piruvato; 27 mg ácido aspártico; 21 mg L-serina; pH 7,4; q.s.p. 1 L de água ultrapura) com 10% de soro fetal bovino, em estufa de CO₂ 5% a 37°C, até atingir a confluência necessária (aproximadamente 95% de confluência). Após o crescimento, as células aderidas na base do frasco foram removidas por desagregação química utilizando tripsina por 5 min, e centrifugadas por 5 min a 264 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi suspenso em meio de cultura MEM suplementado com 10% de SFB e quantificado em câmara de Neubauer para utilização nos testes propostos.

3.4 Análise da viabilidade celular pelos testes colorimétricos em cultura de células de linhagens permanentes

3.4.1 Princípio dos testes colorimétricos

O reagente WST-1 (*Water Soluble Tetrazolium salt*) determina o número de células viáveis em ensaios de proliferação celular e citotoxicidade pelo metabolismo mitocondrial, e em consequência disto, pelo estado fisiológico normal das células, através da atividade de enzimas desidrogenases na presença de um intermediário acceptor de elétrons ao reduzir o

reagente WST-1 em cristal de formazan solúvel em água (TOMINAGA et al., 1999; YIN et al., 2013).

O reagente LDH (*Tetrazolium salt*) determina o número de células em lise ou outro dano na membrana celular plasmática pela liberação da enzima lactato desidrogenase do citosol para o meio externo e por sua atividade ao oxidar lactato em piruvato através da redução de NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ que por sua vez, é reduzido pelo reagente LDH em cristal de formazan solúvel em água (KLÓSEK et al., 2016).

3.4.2 Controle negativo e positivo

O controle negativo utilizado no ensaio foi o DMSO 0,1% (CAS# 67-68-5, pureza \geq 99%) e o controle positivo utilizado tanto para a cultura de células de macrófagos de camundongo RAW 264,7 quanto para a cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2 foi o Triton X-100 (#CAS 9002-93-1) a 2%.

3.4.3 Teste colorimétrico WST-1 para quantificação da viabilidade celular

Em placa de cultura de células de 96 poços, adicionou-se em cada poço 100 μL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB contendo a concentração final de $1,0 \times 10^4$ de células/mL de RAW 264,7 (DMEM) ou HepG2 (MEM). A placa de cultura permaneceu na estufa de CO_2 5%, 37°C, por 24 h.

Para o tratamento das células, foi retirado o meio de cultura e adicionados 100 μL das concentrações do derivado nitro-heterocíclico, controle negativo ou positivo, diluídos em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Em seguida, a placa de cultura celular permaneceu pelo tempo definido de tratamento 3, 24 ou 48 h, em estufa de CO_2 5% a 37°C. Após o tempo de tratamento, o meio de cultura com os tratamentos foi retirado dos poços e foi adicionado PBS, pH 7,4, para lavagem.

Em seguida, foram adicionados 100 μL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e 10 μL de reagente WST-1, e a reação ocorreu no escuro, em estufa de CO_2 5%,

37°C, por 3 h. Após este período, a absorvância foi medida em 450 nm com comprimento de referência de 630 nm em leitor de microplacas ELISA (marca CELER, modelo Polaris).

A viabilidade celular foi expressa como porcentagem das células não tratadas (controle negativo), designadas como 100% de atividade mitocondrial, em relação aos tratamentos. O resultado foi considerado positivo quando a diferença entre os tratamentos for maior e diferente estatisticamente ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) na análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, em relação ao controle negativo, além da presença de uma curva dose-resposta. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada concentração e duas vezes para confirmação dos resultados. O reagente WST-1 foi adquirido da Roche (Cell Proliferation Kit WST-1; Cat. No. 05015944001) e o experimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.4 Teste colorimétrico LDH para quantificação da atividade citotóxica

Em placa de cultura de células de 96 poços, adicionou-se em cada poço 100 μ L de meio de cultura suplementado com 10% de SFB contendo a concentração final de $1,0 \times 10^4$ de células/mL de RAW 264,7 (DMEM) ou HepG2 (MEM). A placa de cultura permaneceu na estufa de CO₂ 5%, 37°C, por 24 h.

Para o tratamento das células, foi retirado o meio presente e adicionados 200 μ L das concentrações do derivado nitro-heterocíclico, controle negativo ou positivo diluídos em meio de cultura suplementado. Em seguida, a placa de cultura celular permaneceu pelo tempo definido de tratamento 3, 24 ou 48 h, em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

Ao fim do tempo de tratamento, foram transferidos 100 μ L do mesmo meio de cultura com os tratamentos para novos poços e foram adicionados 100 μ L de reagente LDH, e a reação ocorreu no escuro por 30 min. Após este período, a absorvância foi medida em 492 nm com comprimento de referência de 630 nm em leitor de microplacas ELISA (marca CELER, modelo Polaris).

A quantificação da lise celular foi expressa em porcentagem das células tratadas com Triton X-100 2% (controle positivo) designadas como 100%, em relação aos tratamentos. Os resultados foram calculados e expressos de acordo com Klósek et al., 2016 e foram considerados positivos quando a diferença entre os tratamentos for maior e diferente

estatisticamente ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) na análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, em relação ao controle positivo, além da presença de uma curva dose-resposta. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada concentração e duas vezes para confirmação dos resultados. O reagente LDH foi adquirido da Roche (Cytotoxicity Detection Kit; Cat. No. 11644793001) e o experimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

3.5 Análise da indução da apoptose e necrose por citometria de fluxo

3.5.1 Controle negativo e positivo

O controle negativo utilizado no ensaio foi o DMSO 1% (CAS# 67-68-5, pureza $\geq 99\%$) e o controle positivo foi meio de cultura DMEM sem SFB (0%).

3.5.2 Análise por citometria de fluxo

Em placa para cultura de células de 24 poços contendo lamínulas circulares estéreis de 13 cm, adicionou-se 1,0 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB contendo a concentração final de $1,0 \times 10^5$ de células/mL de RAW 264,7 (DMEM). A placa de cultura permaneceu na estufa de CO₂ 5%, 37°C, por 24 h.

Para o tratamento das células, foram adicionados 100 μ L das concentrações do derivado nitro-heterocíclico, controle negativo ou controle positivo, em seus respectivos poços. Em seguida, a placa de cultura celular permaneceu pelo tempo definido de tratamento de 3 ou 24 h, em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após o tempo de tratamento, o meio dos poços foram removidos, os poços foram lavados com tampão de FACS (tampão PBS, pH 7,4; SFB 2%; EDTA 5 Mm), as células aderidas foram removidas por desagregação mecânica através de espátula estéril (*scraper*) em 200 μ L de tampão de citometria de fluxo FACS e centrifugadas em microtubo por 5 min, a 800 x g. O sobrenadante foi descartado e o

sedimento celular suspenso em 100 μ L de tampão de ligação (0,01 M HEPES/NaOH; 0,14 M NaCl; 0,25 mM CaCl_2 ; pH 7,4).

Para a determinação quantitativa das células em apoptose e/ou necrose, foram adicionados 5 μ L de anexina V-FITC e 5 μ L de Iodeto de Propídio (PI). A suspensão foi gentilmente homogeneizada e incubada à temperatura ambiente, no escuro, por 15 min. Em seguida, foram adicionados 400 μ L de tampão de ligação e foi feita a leitura em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences). Foram considerados positivos quando a diferença entre os tratamentos for maior e estatisticamente diferente ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$) na análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, em relação ao controle negativo, além da presença de uma curva dose-resposta. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada concentração e duas vezes para confirmação dos resultados. Os reagentes anexina V-FITC e PI foram adquiridos da BD Biosciences (Annexin V-FITC Apoptosis detection kit I; Cat. No. 556547) e o experimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Análise da mutagenicidade pelo teste *Salmonella*/microssoma (teste de Ames)

3.6.1 Linhas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium

O teste *Salmonella*/microssoma, ou teste de Ames, utiliza linhagens (cepas) geneticamente modificadas da bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, deficientes na síntese do aminoácido histidina (*His*), essencial para o crescimento e formação de colônias, e tem a finalidade de detectar a atividade mutagênica induzida pelos compostos através da reversão do fenótipo de deficiência de síntese daquele aminoácido (*His*⁻) para proficiente nesta síntese (*His*⁺), observado através do crescimento de colônias revertentes nas placas de petri contendo meio de cultura definido (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Cada linhagem apresenta uma mutação pré-existente específica no *operon* do gene responsável pelo código genético da histidina. A linhagem TA97 possui mutação no *loci* *hisD6610* e *hisO1242* sinalizando mutações do tipo *frameshift* (mudança no quadro de leitura) por deleção de par de bases -GC- no sítio da mutação que tenha uma sequência de seis

citosinas. As cepas TA98, YG1021 e YG1024 possuem mutação no *locus hisD3052* sinalizando mutações do tipo *frameshift* por adição de par de bases. A linhagem TA100 possui mutação no *locus hisG46* sinalizando mutações por substituição de par de bases que culminam na substituição de uma sequência de síntese de prolina (GGG/CCC) por uma de leucina (GAG/CTC). A linhagem TA102 possui mutação ocre -TAA- no *locus hisG428* evidenciando mutações por substituição de par de bases de todos os tipos induzidos, interessante para detectar mutações induzidas, também, por danos oxidativos através de espécies reativas e agentes *cross-link*. Nesta linhagem, a mutação está localizada em seu plasmídeo pAQ1, ao contrário das demais linhagens onde as mutações se localizam no DNA cromossômico (MARON; AMES, 1983; WATANABE; ISHIDATE; NOHMI, 1989, 1990; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Além da deficiência na síntese do aminoácido histidina, estão presentes outras mutações que conferem maior sensibilidade na detecção da atividade mutagênica de compostos. A mutação *rfa* confere aumento da permeabilidade da membrana celular devido a perda parcial da barreira de polissacarídeo, permitindo a entrada de moléculas maiores. A mutação *uvrB* é uma deleção do gene que codifica o sistema de reparo por excisão de nucleotídeos, mais eficaz e preciso, favorecendo em consequência de um sistema de reparo propenso a erros (*error-prone*). A linhagem TA102 não apresenta esta mutação, pois seu objetivo é detectar mutágenos que exigem este sistema de reparo como de agentes *cross-link*. Por razões técnicas, essa mutação se estende ao gene que codifica a biotina, sendo necessário seu acréscimo nos ensaios (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

As linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102 apresentam o plasmídeo pKM101 (R⁺) que confere resistência ao antibiótico ampicilina e aumenta a sensibilidade do sistema na detecção de substâncias mutagênicas, privilegiando a via de reparo de DNA propenso a erros (*error-prone*). A linhagem TA102 ainda apresenta o plasmídeo pAQ1 que confere resistência ao antibiótico tetraciclina e aumenta os sítios alvos de substâncias mutagênicas (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

A linhagem YG1021 contém o plasmídeo pYG216 e a linhagem YG1024 contém o plasmídeo pYG219, que são responsáveis pela capacidade exacerbada da síntese de enzimas nitroreduases e acetiltransferases, respectivamente. Acredita-se que essas enzimas estejam envolvidas na ativação do efeito mutagênico de aminas aromáticas, de compostos nitroheterocíclicos aromáticos, de aril hidroxilaminas e possivelmente dos derivados nitroheterocíclicos imidazois e triazois (WATANABE; ISHIDATE; NOHMI, 1989, 1990; JOSEPHY et al., 1994).

As características gerais de cada linhagem estão listadas no Quadro 2.

Quadro 2: Relação das linhagens de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium utilizadas nos testes quantitativo de mutagenicidade e controle de citotoxicidade, e suas respectivas características genotípicas.

Linhagem	Alvo genético	Mutação <i>his</i>	Evento mutacional e outras características
TA97	CCCCC	<i>hisD6610</i>	Alteração no quadro de leitura, por deleção de pares de base G-C.
TA98	CGCGCGCG	<i>hisD3052</i>	Alteração no quadro de leitura, por adição de pares de base G-C.
YG1021	CGCGCGCG	<i>hisD3052</i>	Alteração no quadro de leitura, por adição de pares de base G-C; Supercompetente na síntese de enzimas nitroreduases.
YG1024	CGCGCGCG	<i>hisD3052</i>	Alteração no quadro de leitura, por adição de pares de base G-C; Supercompetente na síntese de enzimas acetiltransferases.
TA100	GGG	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de base de G-C para T-A.
TA102	TAA	<i>hisG428</i>	Substituição de pares de base de todos os tipos (transições/transversões); Mutação ocre (TAA); Sensível a compostos que induzam mutações por estresse oxidativo.

Fonte: MARON; AMES, 1983; WATANABE; ISHIDATE; NOHMI, 1989, 1990; MORTELMANS; ZEIGER, 2000.

3.6.2 Controle negativo e positivo

O controle negativo utilizado no ensaio foi o DMSO 1% (CAS# 67-68-5; pureza \geq 99%), e os controles positivos utilizados, na ausência e presença de S9 mix, respectivamente, foram: 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO; CAS# 7608-65-0; pureza \geq 97%) e 2-amino-antraceno (2AA; CAS# 613-13-8; pureza \geq 96%) para TA97, TA98, YG1021 e YG1024;

Azida sódica (AS; CAS# 26628-22-8; pureza \geq 99,5%) e 2AA para TA100; Mitomicina-C (MitC; CAS# 50-07-7; pureza \geq 99%) para TA102.

3.6.3 Metabolização exógena S9 mix

A solução de metabolização exógena (S9 mix) é utilizada com a finalidade de tornar os testes em organismos procariotos mais consistentes, uma vez que a fração S9 mix mimetiza o sistema de metabolização de xenobióticos por enzimas do citocromo P450 presentes principalmente em fígados de mamíferos.

A fração S9 mix utilizada foi adquirida do laboratório Molecular Toxicology Inc. (MoltoxTM, USA) e preparada a partir de fígados de ratos machos *Sprague-Dawley* pré-induzidos por bifenil-policlorinato (Aroclor 1254). O Aroclor 1254 induz a expressão de genes da família CYP2B e CYP1A, podendo levar tanto à inativação quanto à bioativação de xenobióticos, o que dependerá da substância estudada (ZEIGER; CHHABRA; MARGOLIN, 1979; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

A preparação da solução de S9 mix (4%) foi realizada de acordo com Mortelmans e Zeiger (2000). Para 50 mL de S9 mix foi utilizado S9 liofilizado reconstituído em 2,1 mL de água ultrapura estéril (40 mg/mL de proteínas totais); 1,0 mL de MgCl₂-KCl 0,15 M; 0,25 mL de glicose-6-fosfato 1 M; 2,0 mL de NADP 0,1 M; 25 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4; 19,75 mL de água ultrapura estéril.

3.6.4 Teste quantitativo de mutagenicidade e controle de citotoxicidade com pré-incubação

A mutagenicidade foi analisada de acordo com Mortelmans e Zeiger (2000), utilizando as linhagens de *S. enterica* descritas no Quadro 2. As linhagens cresceram por 16 h em meio LB (caldo lisogênico ou Luria Bertani), alcançando-se a fase estacionária contendo 1,0-2,0 x 10⁹ células/mL. Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 μ L de cultura bacteriana, 500 μ L de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4, para o ensaio sem ativação metabólica, ou 500 μ L de S9 mix para o ensaio com ativação metabólica, e 100 μ L das concentrações do

derivado nitro-heterocíclico, controle negativo ou controle positivo. Em seguida, os tubos de ensaio foram pré-incubados por 20 min, a 37°C, com agitação constante.

Para o teste de controle da citotoxicidade, 10 µL da préincubação anteriormente citada foram diluídas em NaCl 0.9% para a obtenção de uma suspensão contendo $2,0 \times 10^3$ células/mL. Desta suspensão, uma alíquota de 100 µL foi plaqueada em meio LB sólido. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 h e as colônias contadas. A citotoxicidade foi considerada positiva quando a sobrevivência celular foi menor que 70% em relação ao controle negativo, com dose-resposta e os valores estatisticamente significativos (AIUB et al., 2004).

Para o teste de mutagenicidade, foram adicionados 2,0 mL de top ágar, suplementado com 10% de histidina e 10% de biotina, em cada tubo, e esta solução vertida em placas de petri contendo meio definido. Em seguida, foram incubadas em estufa a 37°C, por 72 h. Ao fim da incubação, as colônias revertentes *His*⁺ foram contadas e o índice de mutagenicidade (I.M.) determinado pela razão do número de revertentes (espontâneos e induzidos, caso exista) da amostra pelo número de revertentes (espontâneos) do controle negativo.

O resultado foi considerado positivo (substância considerada mutagênica), quando o I.M. foi igual ou superior a dois, quando $p < 0,05$ ou $p < 0,01$ na análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, além da presença de uma curva dose-resposta, para uma ou mais linhagens de *S. enterica* (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada concentração e duas vezes para confirmação dos resultados.

O teste *Salmonella*/microssoma seguiu as diretrizes determinadas pela OECD (1997) e ANVISA (2013).

3.7 Análise da genotoxicidade pelo teste do micronúcleo em cultura de células de linhagens permanentes

3.7.1 Controle negativo e positivo

O controle negativo utilizado no ensaio foi o DMSO 1% (CAS# 67-68-5, pureza \geq 99%) e o controle positivo utilizado para a cultura de células de macrófagos de camundongo

RAW 264,7 foi o 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG; CAS# 70-25-7, pureza $\geq 97\%$), 0,5 μM , e para a cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2 foi o benzo-alfa-pireno (BaP; CAS# 50-32-8, pureza $\geq 96\%$), 5 μM .

3.7.2 Teste do micronúcleo

Em placa para cultura de células de 24 poços contendo lamínulas circulares estéreis de 13 cm, adicionou-se 1,0 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB contendo a concentração final de $1,0 \times 10^5$ de células/mL de RAW 264,7 (DMEM) ou HepG2 (MEM). A placa de cultura permaneceu na estufa de CO_2 5%, 37°C, por 24 h.

Para o tratamento das células, foram adicionados 100 μL das concentrações do derivado nitro-heterocíclico, controle negativo ou controle positivo, em seus respectivos poços. Em seguida, a placa de cultura celular permaneceu pelo tempo definido de tratamento 3 ou 24 h, em estufa de CO_2 5% a 37°C. Após o tempo de tratamento, as células aderidas foram lavadas com tampão McIlvaine (ácido crítico 0,1 M; Na_2HPO_4 0,2 M; pH 7,5). Em seguida, adicionou-se aos poços meio de cultura. Por fim, a placa de cultura permaneceu na estufa de CO_2 5%, 37°C, por 24 h.

Após esse período, foi retirado o meio de cultura dos poços e adicionado 1,0 mL de fixador (metanol 100%:ácido acético glacial 100%, 3:1 V/V), mantido por 15 min. Em seguida, retirou-se o fixador dos poços que foram lavados com tampão McIlvaine.

A coloração das células por solução de 3 mM de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido; dissolvida em tampão McIlvaine) foi realizada em ambiente escuro, adicionando-se 500 μL aos poços, mantidos por 40 min. Em seguida, lavou-se por duas vezes cada poço com 1,0 mL de tampão McIlvaine.

Por fim, as lamínulas circulares com as células aderidas e tratadas foram analisadas quanto ao aparecimento de células micronucleadas, na observação total de 2000 células para cada concentração, em microscópio de fluorescência com luz azul de comprimento de onda 430 nm.

O resultado foi considerado positivo quando a diferença entre a contagem de células micronucleadas das concentrações for maior e diferente estatisticamente ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$), na análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, em relação ao controle

negativo, além da presença de uma curva dose-resposta. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada concentração e duas vezes para confirmação dos resultados. O teste do micronúcleo seguiu as diretrizes determinadas pela OECD (2016).

3.8 Análise da expressão relativa de genes do citocromo P450 pela reação em cadeia da polimerase

3.8.1 Tratamento da cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2

Em placa de 6 poços para cultura de células, adicionou-se em cada poço 1,5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB contendo a concentração final de $2,0 \times 10^5$ de células/mL. A placa de cultura permaneceu na estufa de CO₂ 5%, 37°C, por 24 h.

Para o tratamento das células, foram adicionados 100 µL do controle negativo (DMSO 1%) ou do derivado nitro-heterocíclico, em seus respectivos poços. Em seguida, a placa de cultura celular permaneceu por 24 h em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após o tempo de tratamento, as células aderidas foram lavadas três vezes com tampão PBS, pH 7,4, preparado em água destilada tratada com dicarbonato de dietila 0,1% (DEPC). Após a última lavagem, o tampão foi descartado para dar início à etapa de extração do RNA. Os experimentos foram realizados em triplicada de no mínimo três passagens diferentes da cultura de células de linhagem permanente para a confirmação dos resultados.

3.8.2 Extração e quantificação de RNA total

A extração do RNA foi realizada pelo reagente TRIzol® (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

Foram adicionados 1 mL de reagente TRIzol® gelado por poço, repousando por 3 min à temperatura ambiente. Em seguida, os volumes adicionados foram transferidos para microtubos, adicionados 200 µL de clorofórmio gelado, homogeneizados por inversão,

permaneceram por 5 min à temperatura ambiente e foram centrifugados a 16200 x g por 15 min, a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa transparente) de cada microtubo foi transferido para novos microtubos.

Após esta etapa foram adicionados aos microtubos 500 µL de isopropanol gelado, homogeneizados três vezes por inversão, permaneceram por 15 min à temperatura ambiente e foram centrifugados a 16200 x g por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, os sedimentos foram suspensos em etanol 75% gelado, homogeneizados três vezes por inversão e centrifugados 16200 x g por 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, os microtubos descansaram à temperatura ambiente até o etanol evaporar completamente e os precipitados foram ressuspensos em água ultrapura livre de RNAses e DNAses (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific).

A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria, realizado no espectrofotômetro Nanovue™ da GE Healthcare Life Sciences, utilizando uma relação (razão) dos valores de absorvância dos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, e 260 e 230 nm, que indicam o grau de pureza e presença de proteínas e/ou solventes, respectivamente, da extração de RNA.

3.8.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) e de acordo com as instruções do fabricante.

Em microtubos de 0,2 mL, as amostras de RNA foram retro-transcritas em DNA complementar. Adicionou-se o volume correspondente a 4 µg de RNA extraído, 1 µL de oligo(dT)₂₀ 50 µM, 1 µL de tampão de anelamento e a quantidade de água ultrapura necessária para completar o volume final de 8 µL. Os microtubos foram incubados por 5 min em termociclador (Bio-Rad MyCycler™ Personal Thermal Cycler) pré-aquecido a 65°C e por 1 min em gelo.

Em seguida, foram adicionados 10 µL da solução concentrada First-Strand Reaction Mix e 2 µL do reagente SuperScript™/RNaseOUT™ Enzyme Mix, os microtubos foram incubados em termociclador por 50 min a 50°C, e a reação foi finalizada a 85°C, por 5 min.

3.8.4 Primers dos genes do citocromo P450

Para amplificação do DNA complementar foram utilizados os pares de oligonucleotídeos referentes as sequências de genes do citocromo P450 humano (CYP3A4, 1A2, 2B6 e 2E1) e do controle de expressão gênica normal (GAPDH), como descritos no Quadro 3.

Quadro 3: Sequências de *primers* utilizadas na análise da expressão relativa de genes do citocromo P450.

Gene alvo	Sequência senso	Sequência anti-senso
CYP3A4	5`-GAT TGA CTC TCA GAA TTC AAA AGA AAC TGA-3`	5`-GGT GAG TGG CCA GTT CAT ACA TAA TG-3`
CYP1A2	5`-TGT TCA AGC ACA GCA AGA AGG-3`	5`-TGC TCC AAA GAT GTC ATT GAC-3`
CYP2B6	5`-CCC TCA GGA CAC AGA AGT ATT TC-3`	5`-GAT TGA AGG CGT CTG GTT TTT C-3`
CYP2E1	5`-TTC AGC GGT TCA TCA CC CT-3`	5`-GAG GTA TCC TCT GAA AAT GGT GTC-3`
GAPDH	5`-GAA GGT GAA GGT CGG AGT CAA C-3`	5`-CAG AGT TAA AAG CAG CCC TGG T-3`

3.8.5 Quantificação da expressão relativa de genes do citocromo P450 por qPCR

A reação da polimerase em cadeia quantitativa foi realizada no termociclador Rotor-Gene Q da QIAGEN utilizando o marcador fluorescente SYBR® Green e microtubos de 0,1 mL do kit Rotor-Gene SYBR® Green RT, de acordo com as instruções do fabricante, na análise da expressão dos genes do citocromo P450 na cultura de células HepG2.

Em microtubos de 0,1 mL, foram adicionados 5 μ L de SYBR® Green, 2,5 μ L de cDNA (1:625), 2,0 μ L de água ultrapura e 0,5 μ L de uma solução contendo o *primer* senso e anti-senso 0,5 mM.

No termociclador, os microtubos foram acomodados, a reação foi iniciada por 10 min a 95°C, seguida de quarenta e cinco ciclos de amplificação, onde um ciclo correspondeu ao tempo de 20 s a 95°C (desnaturação) e 45 s a 60°C (anelamento e extensão). Ao final dos ciclos, foi realizada uma curva de dissociação (*melting*) para avaliar a formação de dímeros.

A eficiência considerada aceitável foi de até 10% na diferença entre eficiências dos genes do citocromo P450 e o gene de referência (GAPDH), assim como uma inclinação da curva $\leq 0,1$. Os resultados foram determinados pelo *software* proprietário Rotor-Gene Q Series, fornecido pelo fabricante, e analisados de acordo com a quantificação relativa utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) em relação a expressão normal do controle negativo.

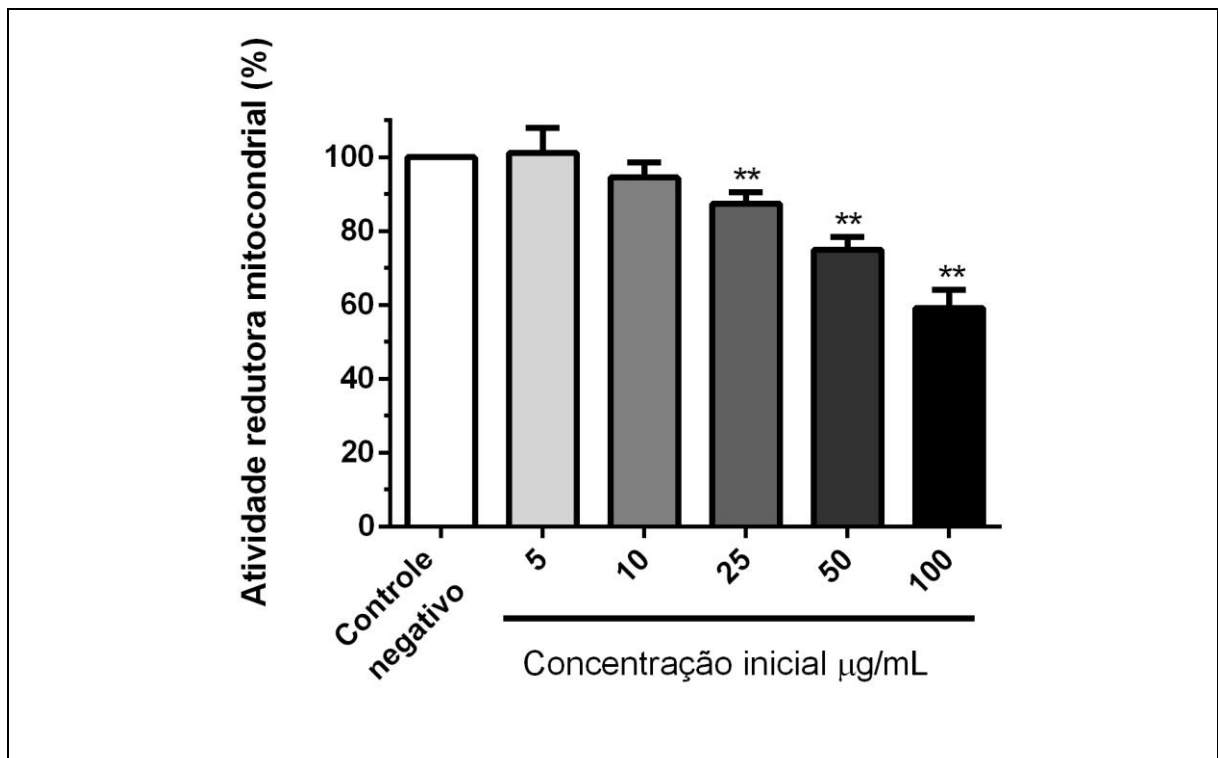
4 RESULTADOS

4.1 PNING 43-14

4.1.1 Análise da atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y

Na análise da atividade tripanocida do nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 14), no tratamento do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, fase evolutiva amastigota, observou-se a diminuição dose-dependente da viabilidade celular dessas células, pelo teste colorimétrico MTT, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 25 a 100 µg/mL, com redução máxima de aproximadamente 40%.

Figura 14: Atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.



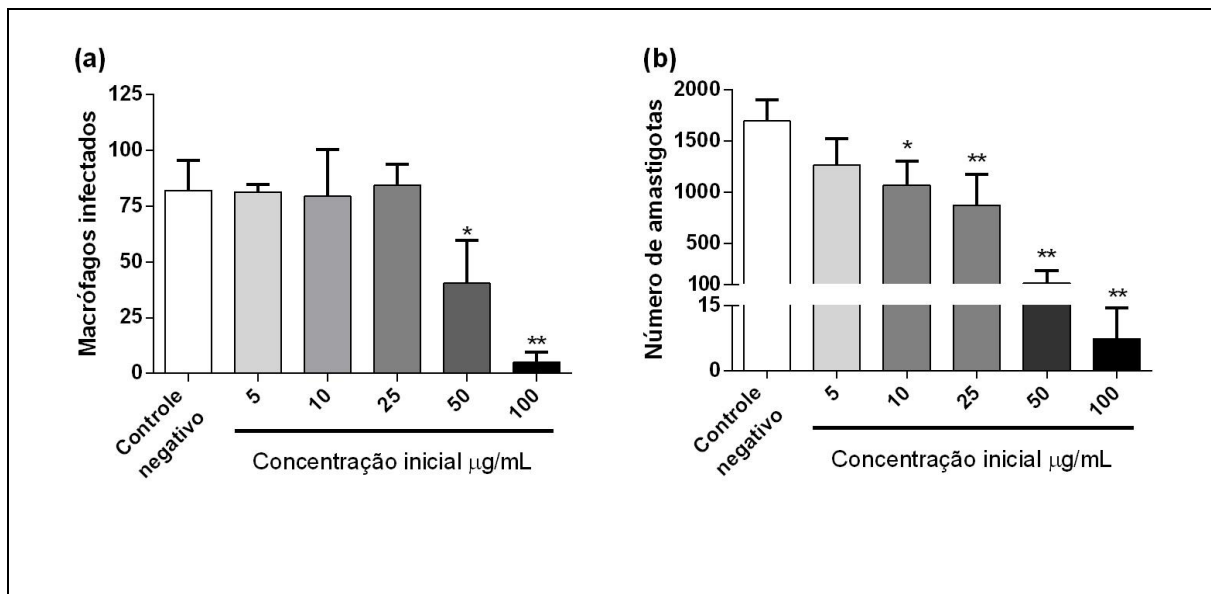
Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de quintuplicatas.

Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.1.2 Análise da atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y

Na análise da atividade tripanocida do nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 15), no tratamento de macrófagos peritoneais infectados por *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, fase evolutiva amastigota, observou-se: a diminuição da população de macrófagos infectados, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL (Figura 15a); e a diminuição dose-dependente da população de *T. cruzi* no interior dos macrófagos, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 10 a 100 µg/mL (Figura 15b).

Figura 15: Atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, expostos ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.

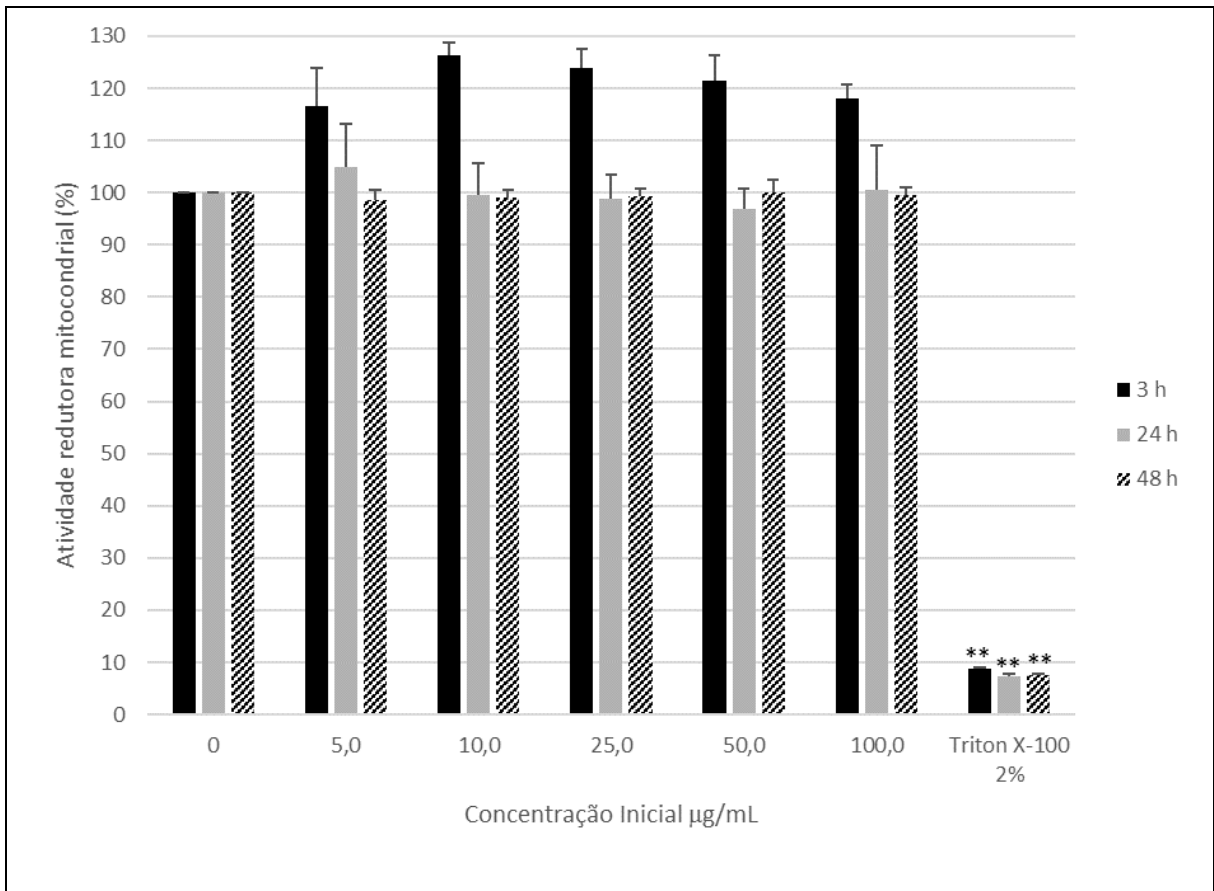


Legenda: (a) número de macrófagos infectados, (b) número de amastigotas infectando macrófagos. Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.1.3 Análise da viabilidade celular pelo teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagens permanentes

Na análise da viabilidade da cultura de macrófagos RAW 264,7 exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 16), por teste colorimétrico WST-1, que analisa a interferência no funcionamento normal das mitocôndrias das células, os tratamentos não induziram danos às células, independente de concentração e tempo de exposição, por esse método.

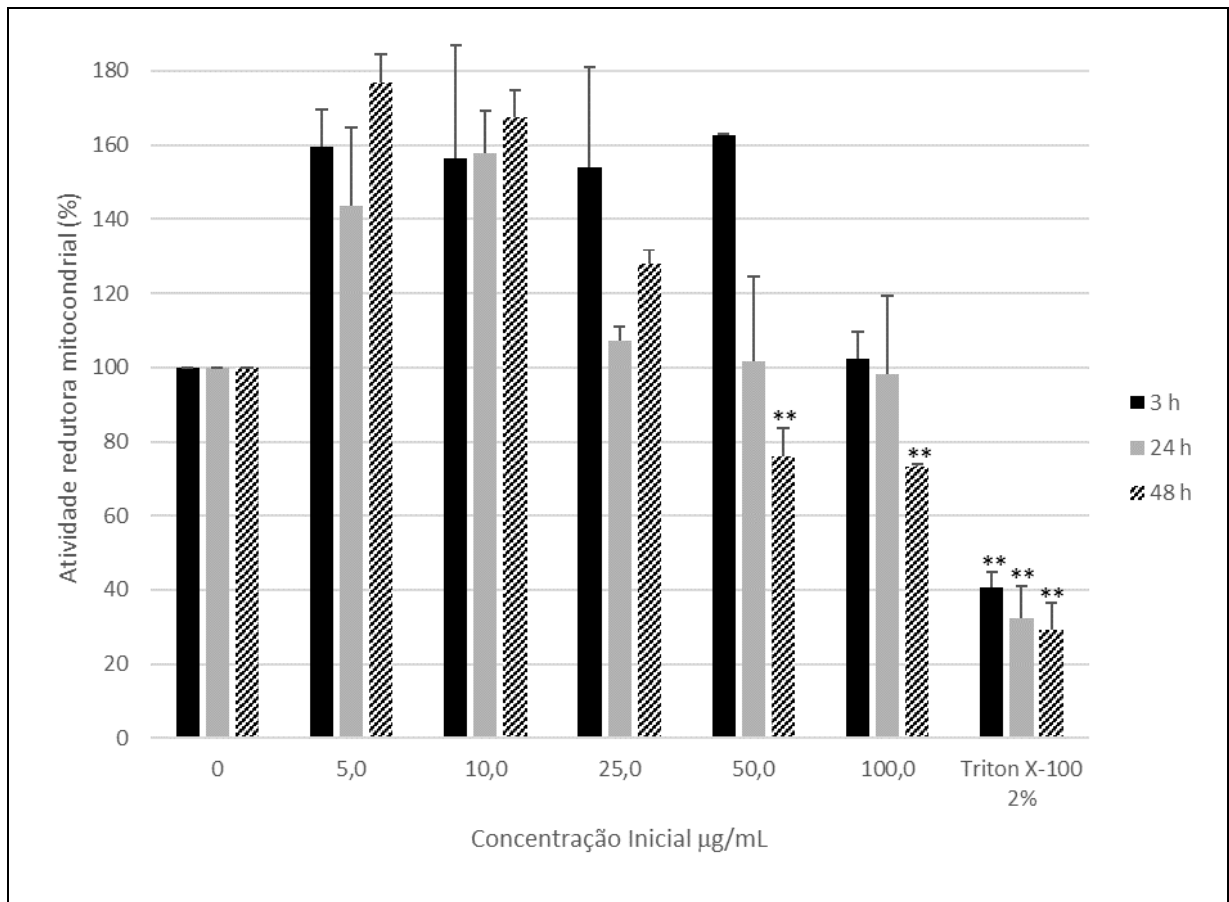
Figura 16: Teste de viabilidade celular WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.



Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

Na análise da viabilidade da cultura de hepatocarcinoma humano HepG2 exposta ao tratamento (Figura 17), observou-se danos dose-dependente às células, por esse método, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, depois de 48 h de exposição.

Figura 17: Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.

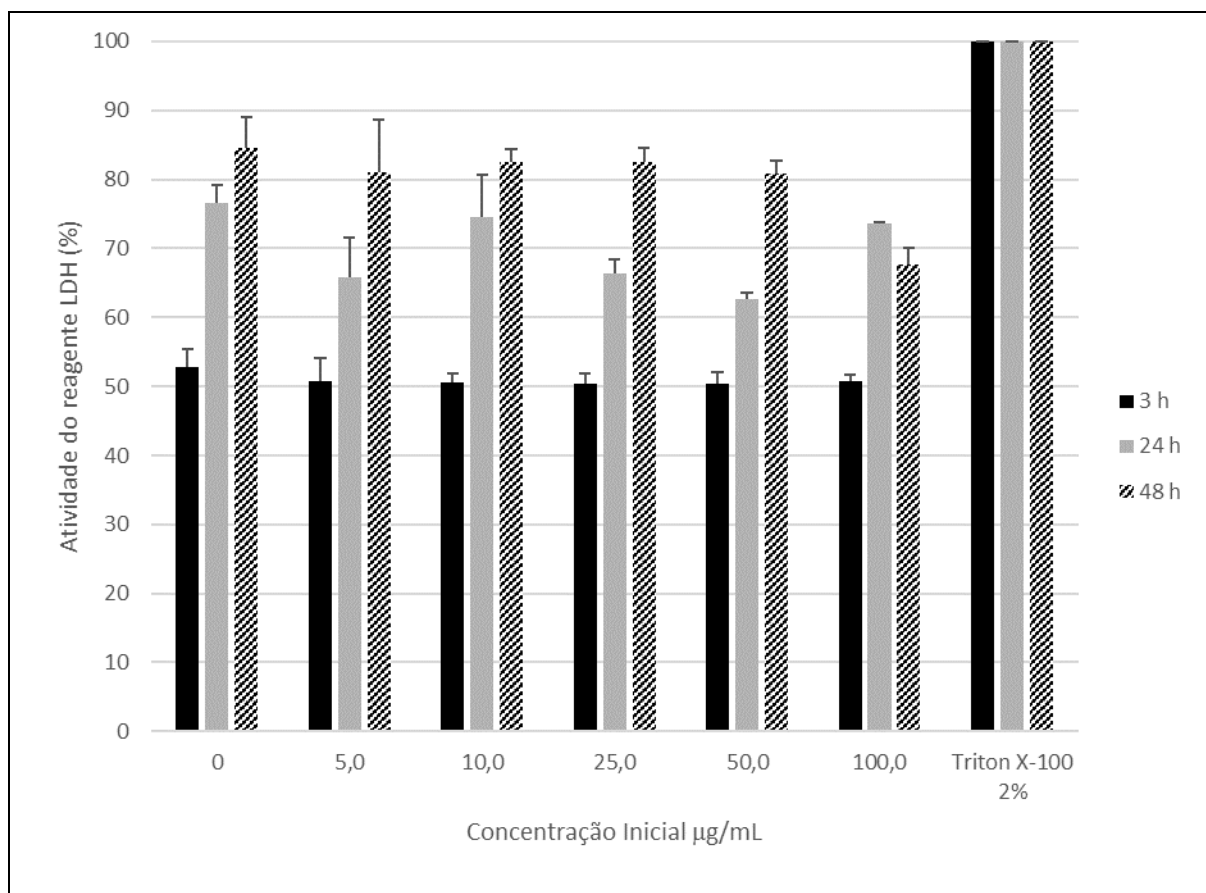


Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.1.4 Análise da atividade citotóxica pelo teste colorimétrico LDH em cultura de células linhagens permanentes

Na análise da atividade citotóxica de macrófagos RAW 264,7 exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 18), por teste colorimétrico LDH, que analisa a integridade da membrana plasmática das células, o tratamento não induziu dano, por esse método, independente de concentração e tempo de exposição.

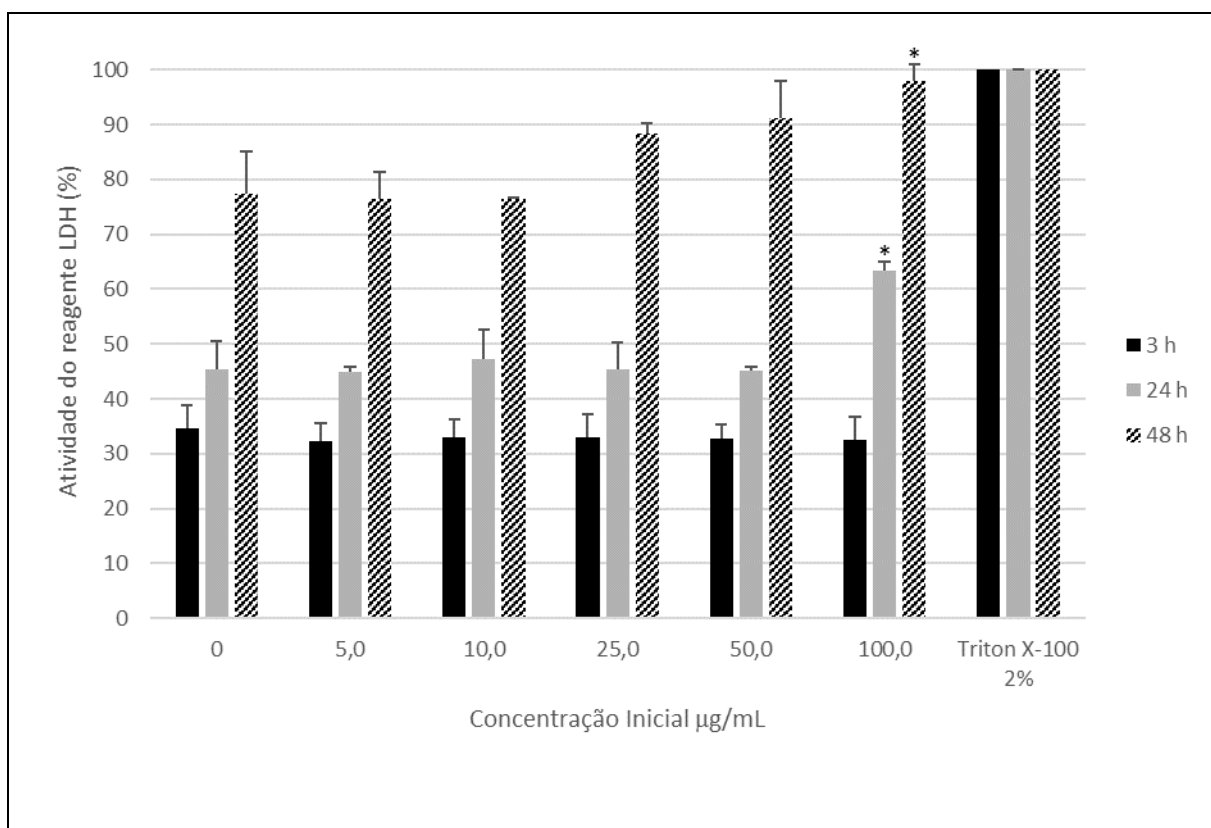
Figura 18: Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.



Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

Na análise da viabilidade da cultura de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 19), por teste colorimétrico LDH, o tratamento induziu dano à membrana plasmática das células, apenas na maior concentração (100 µg/mL), nos tempos de tratamento de 24 e 48 h, com diferença estatística significativa.

Figura 19: Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.

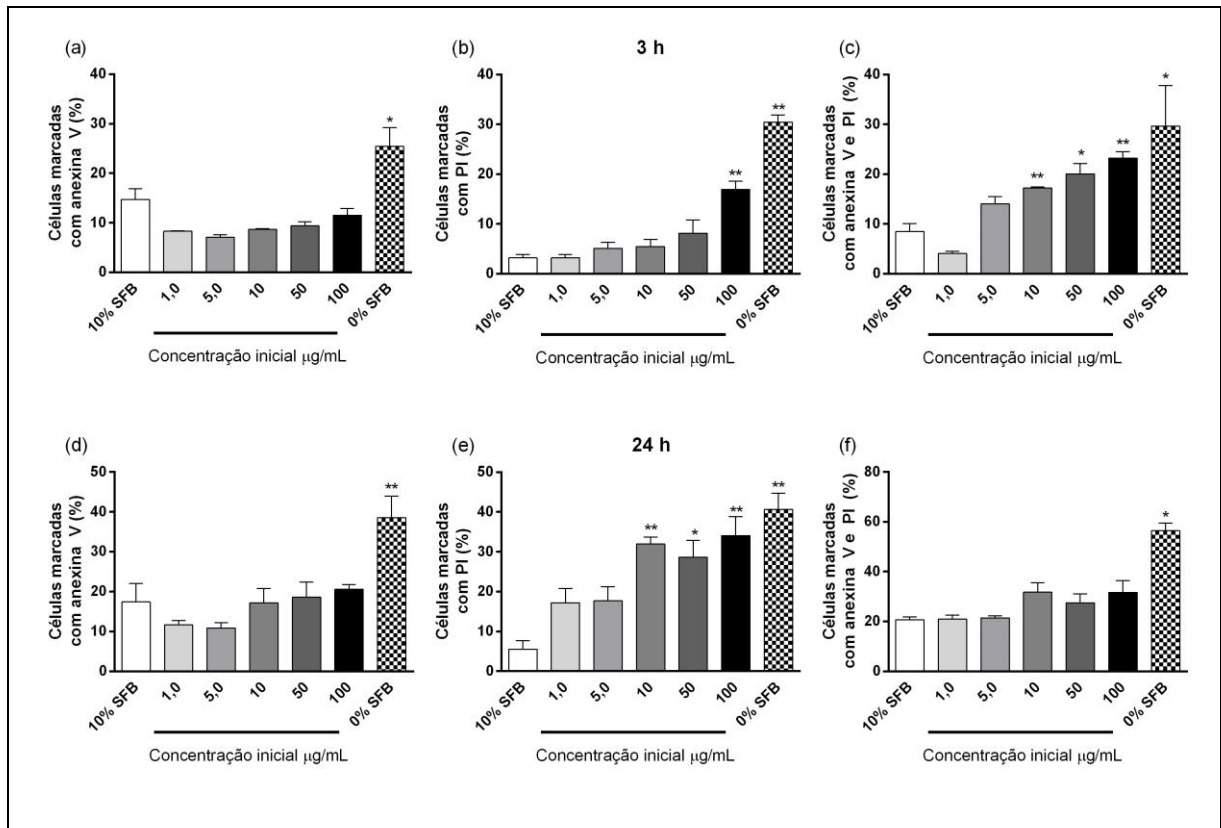


Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.1.5 Análise da indução da apoptose e necrose por citometria de fluxo

Na análise da indução da apoptose, indicada pela ligação da anexina V à fosfatidilserina, e da necrose, indicada pela atividade intercalante do iodeto de propídio, no tratamento da cultura de células de linhagem permanente de macrófagos RAW 264,7 com o derivado PNING 43-14 (Figura 20), por citometria de fluxo, observou-se após 3 h de tratamento células em necrose (Figura 20b), com diferença estatística significativa, em uma relação dose-resposta, na maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$), e células em apoptose tardia (ligadas à anexina V e intercaladas com iodeto de propídio, ao mesmo tempo), em uma relação dose-resposta nas concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, com diferença estatística significativa (Figura 20c). Após 24 h de tratamento, foram observadas células em necrose (intercaladas com iodeto de propídio, somente), em uma relação dose-resposta nas concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, com diferença estatística significativa. Não foram observadas células em apoptose após 3 h ou 24 h de tratamento (Figuras 20a e 20d).

Figura 20: Análise da indução da apoptose e necrose em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.

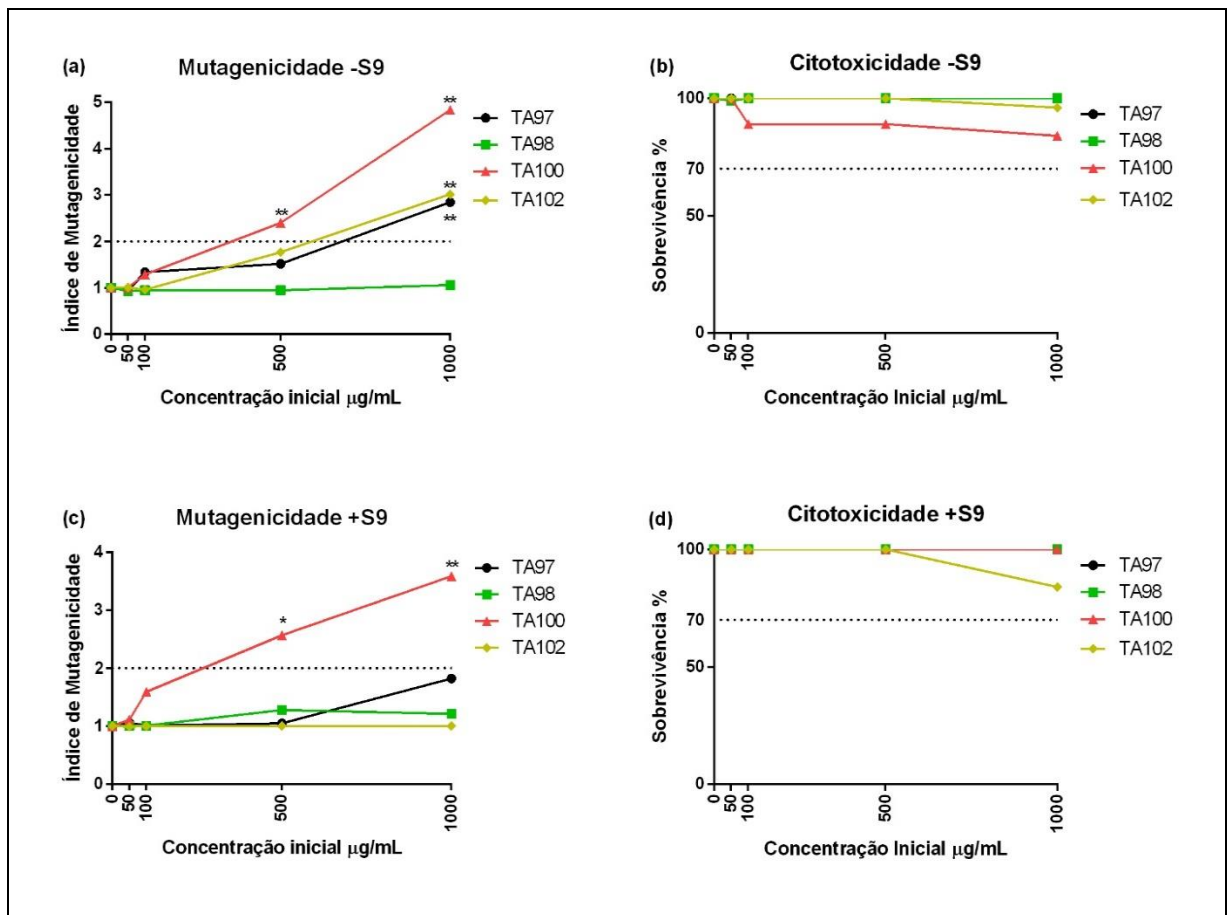


Legenda: (a) percentagem de células marcadas com anexina V após 3 h de tratamento; (b) percentagem de células marcadas com PI após 3 h de tratamento; (c) percentagem de células marcadas com anexina V e PI após 3 h de tratamento; (d) percentagem de células marcadas com anexina V após 24 h de tratamento; (e) percentagem de células marcadas com PI após 24 h de tratamento; (f) percentagem de células marcadas com anexina V e PI após 24 h de tratamento. Valores percentuais expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo. PI = iodeto de propídio; SFB = soro fetal bovino.

4.1.6 Análise da mutagenicidade pelo teste *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102

Na análise da mutagenicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 21), pelo teste *Salmonella*/microsoma, observou-se: a atividade mutagênica dose-dependente, por alteração no quadro de leitura (deleção de pares de base G-C), no tratamento da linhagem TA97 (1000 µg/mL); e por substituição de pares de bases, no tratamento das linhagens TA100 (500 e 1000 µg/mL) e TA102 (1000 µg/mL), na ausência de S9 mix, com diferença estatística significativa (Figura 21a). Além disso, observou-se atividade mutagênica dose-dependente, por substituição de pares de bases, na presença de S9 mix, no tratamento da TA100 (500 e 1000 µg/mL), com diferença estatística significativa (Figura 21c). Não foi observada a atividade citotóxica no tratamento das linhagens, independente da presença de metabolização exógena (Figuras 21b e 21d).

Figura 21: Teste *Salmonella*/microsoma com linhagens de *S. enterica* TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.

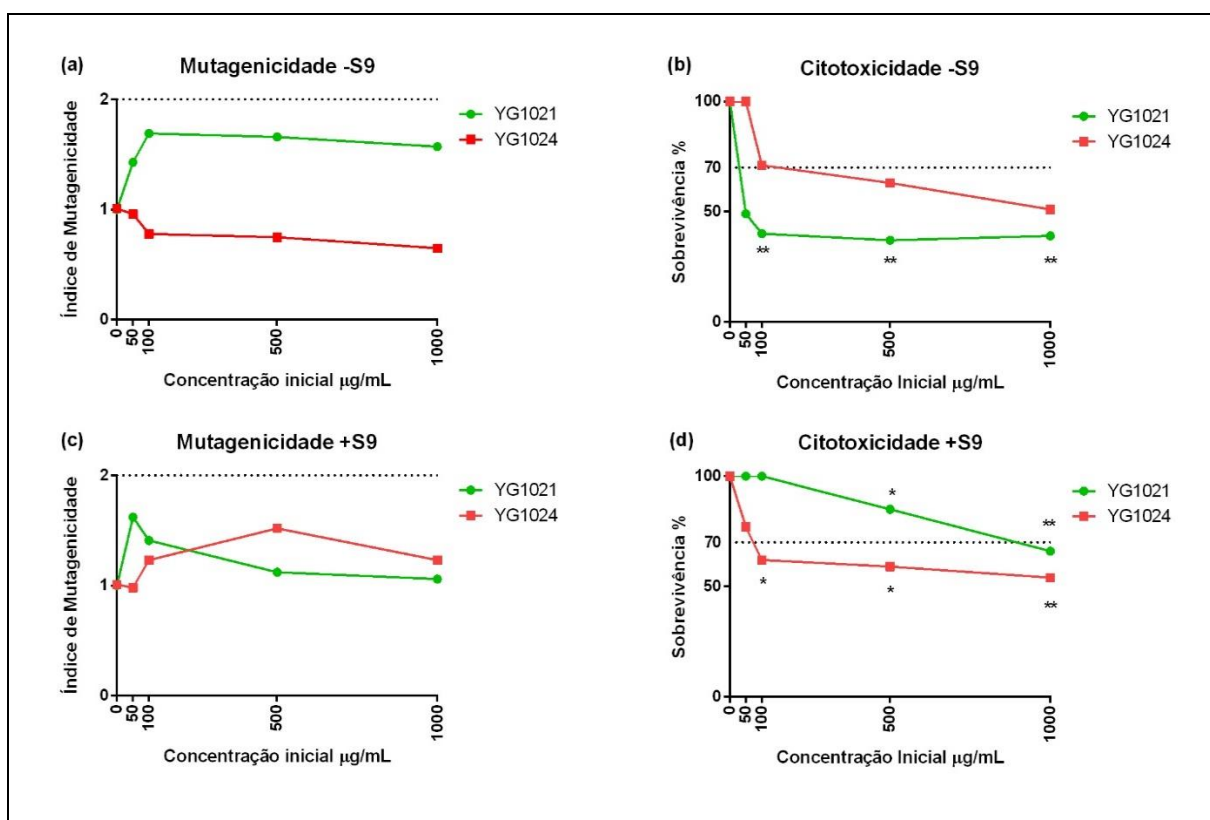


Legenda: (a) mutagenicidade na ausência de S9 mix, (b) citotoxicidade na ausência de S9 mix, (c) mutagenicidade na presença de S9 mix, (d) citotoxicidade na presença de S9 mix. A mutagenicidade é expressa nos valores de índice de mutagenicidade para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. A citotoxicidade é expressa nos valores percentuais de sobrevivência para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. Diferença estatística significativa dos resultados (índice de mutagenicidade ≥ 2 ; Sobrevivência $< 70\%$) na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.1.7 Análise da mutagenicidade pelo teste *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens YG1021 e YG1024

Na análise da mutagenicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 22), utilizando linhagens de *S. enterica* YG1021 e YG1024, não foi observada a atividade mutagênica no tratamento das linhagens, independente de metabolização exógena (Figuras 22a e 22c). No entanto, observou-se a atividade citotóxica, na ausência de S9 mix (Figura 22b), no tratamento da linhagem YG1021 (100 a 1000 µg/mL), com diferença estatística significativa; e no tratamento da linhagem YG1024 (500 e 1000 µg/mL). Na presença de S9 mix (Figura 22d), observou-se a atividade citotóxica no tratamento das linhagens YG1021 (1000 µg/mL) e YG1024 (100, 500 e 1000 µg/mL), com diferença estatística significativa.

Figura 22: Teste *Salmonella*/microsoma com linhagens de *S. enterica* YG1021 e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.

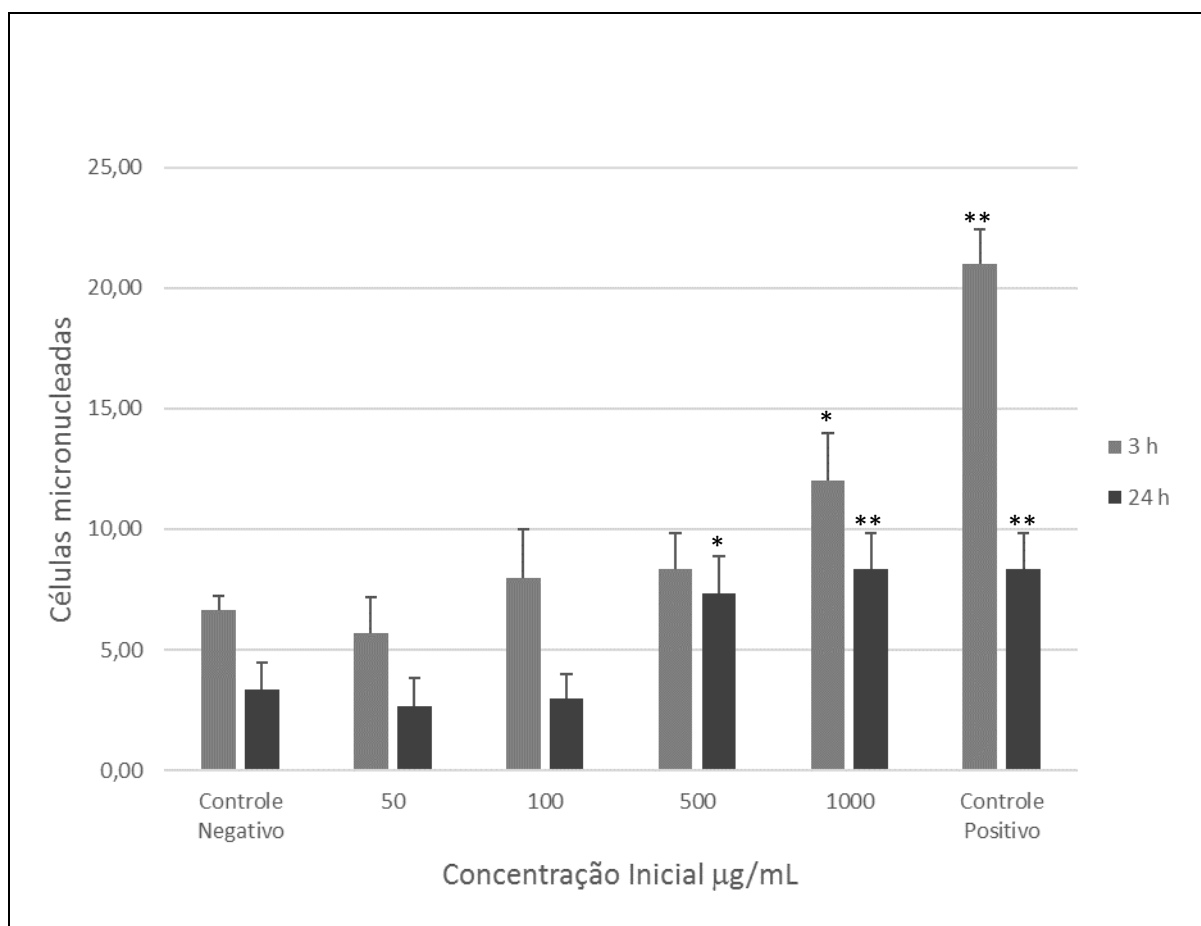


Legenda: (a) mutagenicidade na ausência de S9 mix, (b) citotoxicidade na ausência de S9 mix, (c) mutagenicidade na presença de S9 mix, (d) citotoxicidade na presença de S9 mix. A mutagenicidade é expressa nos valores de índice de mutagenicidade para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. A citotoxicidade é expressa nos valores percentuais de sobrevivência para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. Diferença estatística significativa dos resultados (índice de mutagenicidade ≥ 2 ; Sobrevivência $< 70\%$) na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.1.8 Análise da genotoxicidade pelo teste do micronúcleo em cultura de células de linhagens permanentes

Na análise da genotoxicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 23), na formação de células micronucleadas, utilizando cultura de células de macrófago RAW 264,7, observou-se a atividade genotóxica dose dependente, com diferença estatística significativa, apenas na maior concentração (1000 $\mu\text{g/mL}$), após 3 h de tratamento; e nas duas maiores concentrações (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), após 24 h de tratamento.

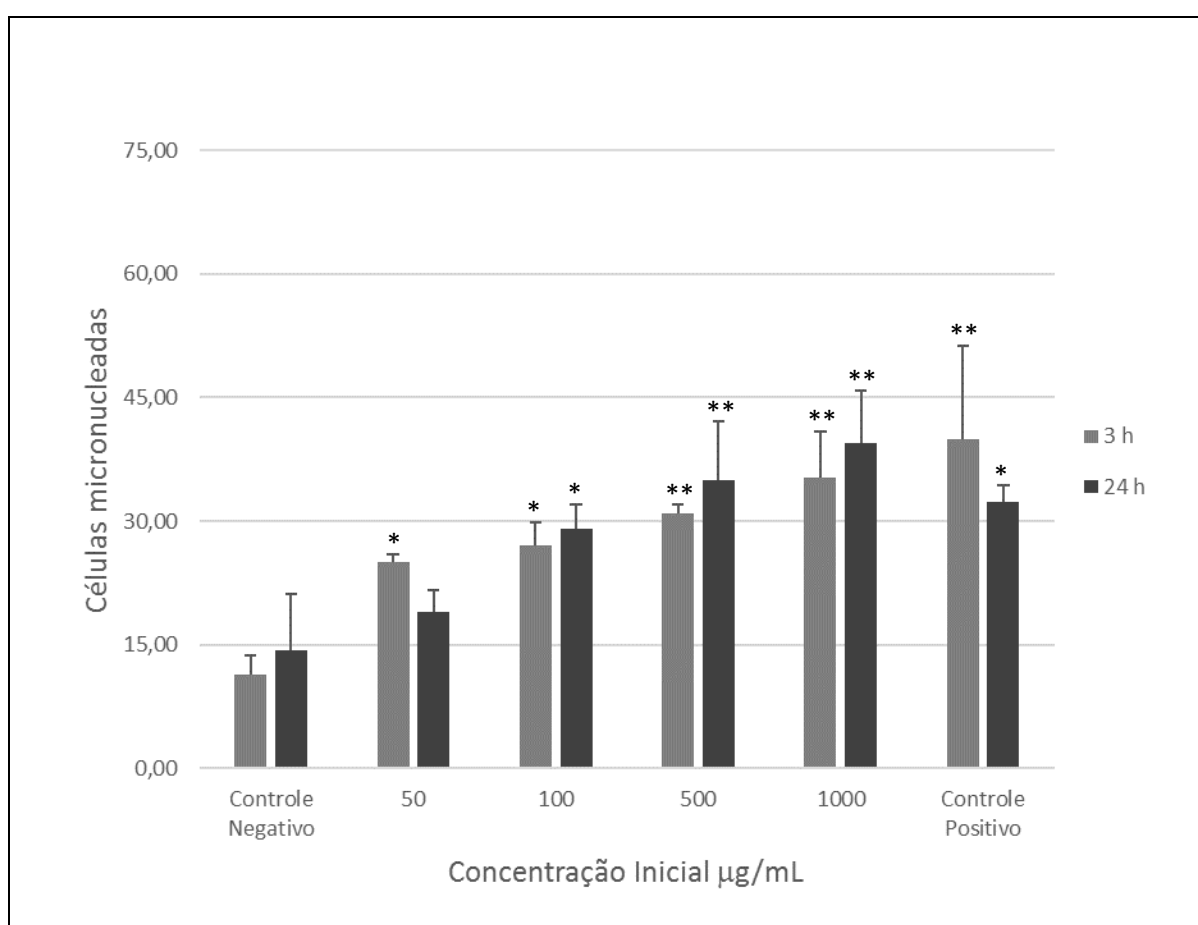
Figura 23: Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.



Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

Na análise da genotoxicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 24), utilizando cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2, observou-se a atividade genotóxica dose-dependente, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 50 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, após 3 h de tratamento; e atividade genotóxica dose-dependente, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, após 24 h de tratamento.

Figura 24: Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.

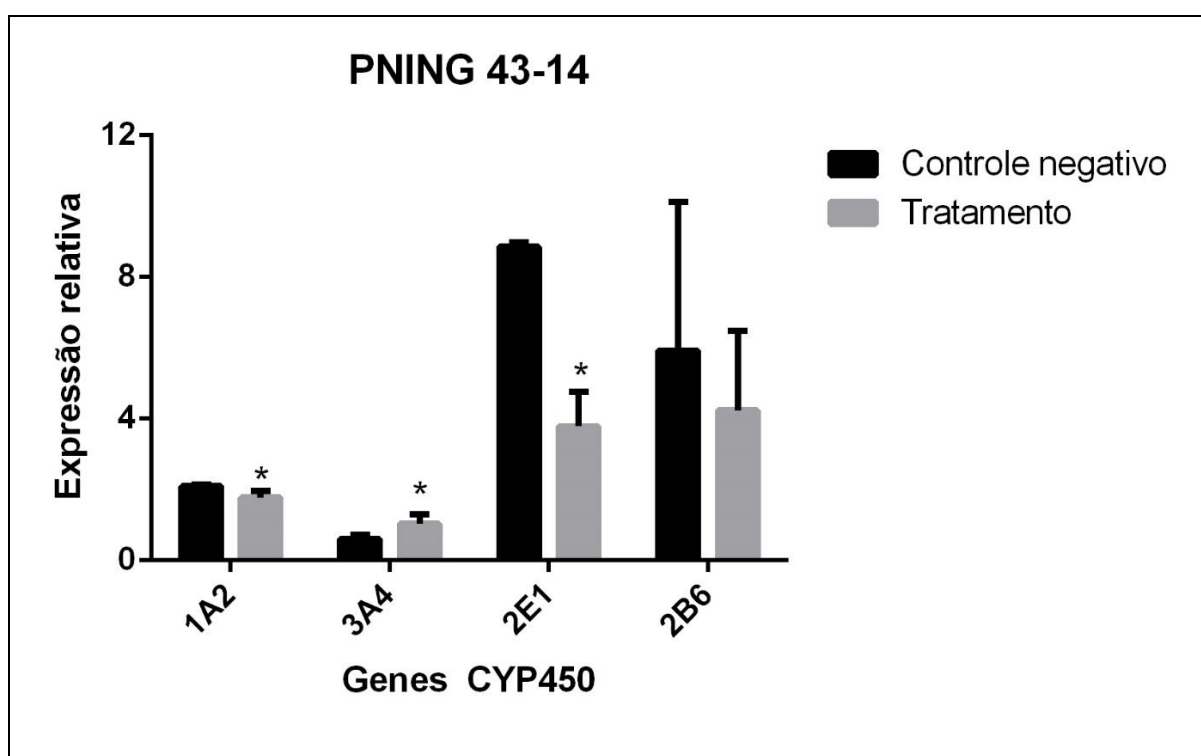


Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.1.9 Análise da expressão relativa de genes do citocromo P450 pela reação em cadeia da polimerase

Na análise da expressão de genes do citocromo P450 de cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2 (Figura 25), responsáveis pela metabolização de xenobióticos, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14 (100 µg/mL), observou-se a indução da expressão dos genes das subfamília CYP3A4, e a inibição das subfamílias CYP1A2, CYP2E1 e CYP2B6, em relação ao controle negativo.

Figura 25: Expressão relativa de genes do citocromo P450 de cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 43-14.



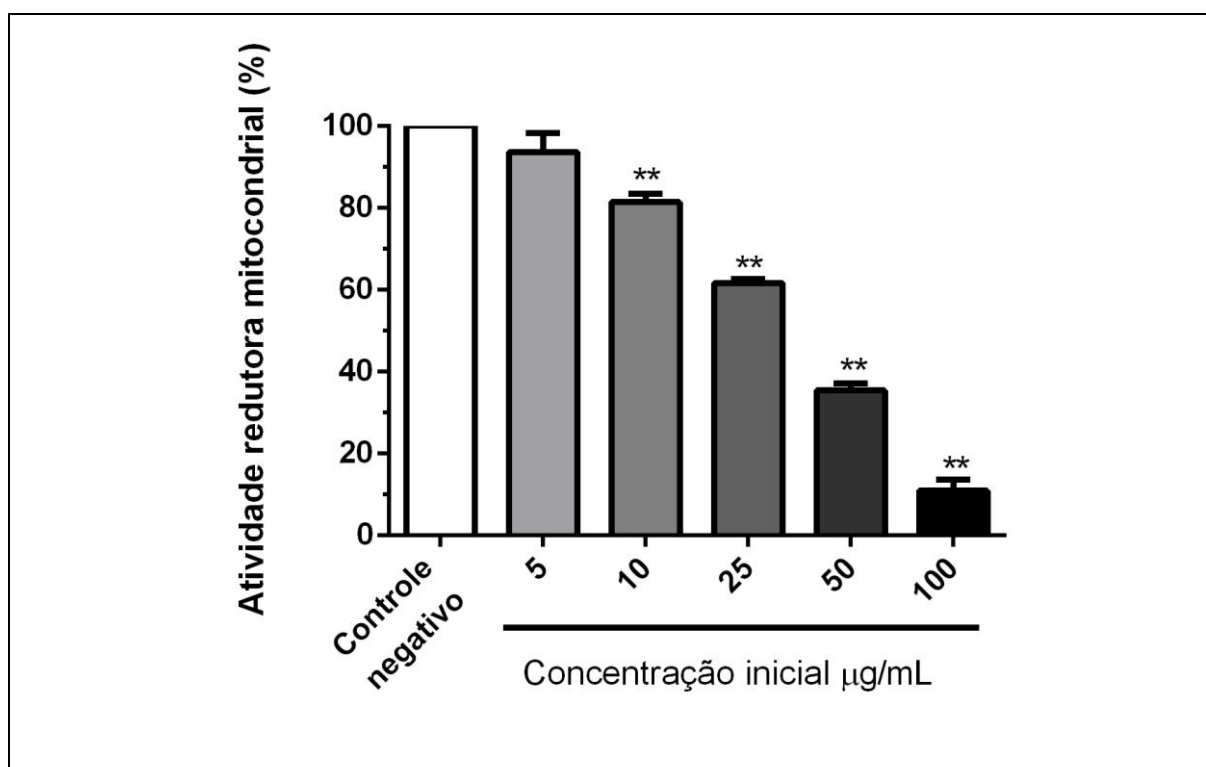
Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados no teste de *t* de Student quando * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.2 PNING 47-13

4.2.1 Análise da atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y

Na análise da atividade tripanocida do nitro-heterocíclico PNING 47-13 (Figura 26), no tratamento do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, fase evolutiva amastigota axênica, observou-se a diminuição dose-dependente da viabilidade celular para essas células, pelo teste colorimétrico MTT, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 10 a 100 µg/mL, com redução máxima de aproximadamente 90%.

Figura 26: Atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.

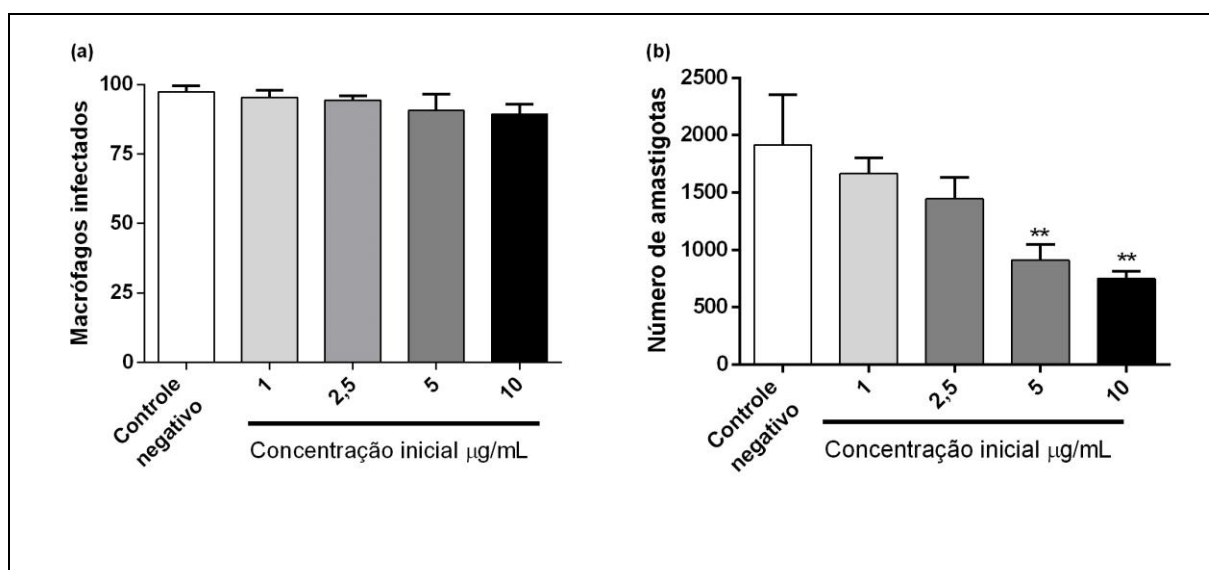


Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de quintuplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.2.2 Análise da atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y

Na análise da atividade tripanocida do nitro-heterocíclico PNING 47-13 (Figura 27) no tratamento de macrófagos peritoneais infectados por *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, fase evolutiva amastigota, não foi observada a diminuição da população de macrófagos infectados (Figura 27a); mas foi observada a diminuição dose-dependente da população de *T. cruzi* no interior dos macrófagos (infectados), com diferença estatística significativa, nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 27b).

Figura 27: Atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, expostos ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.

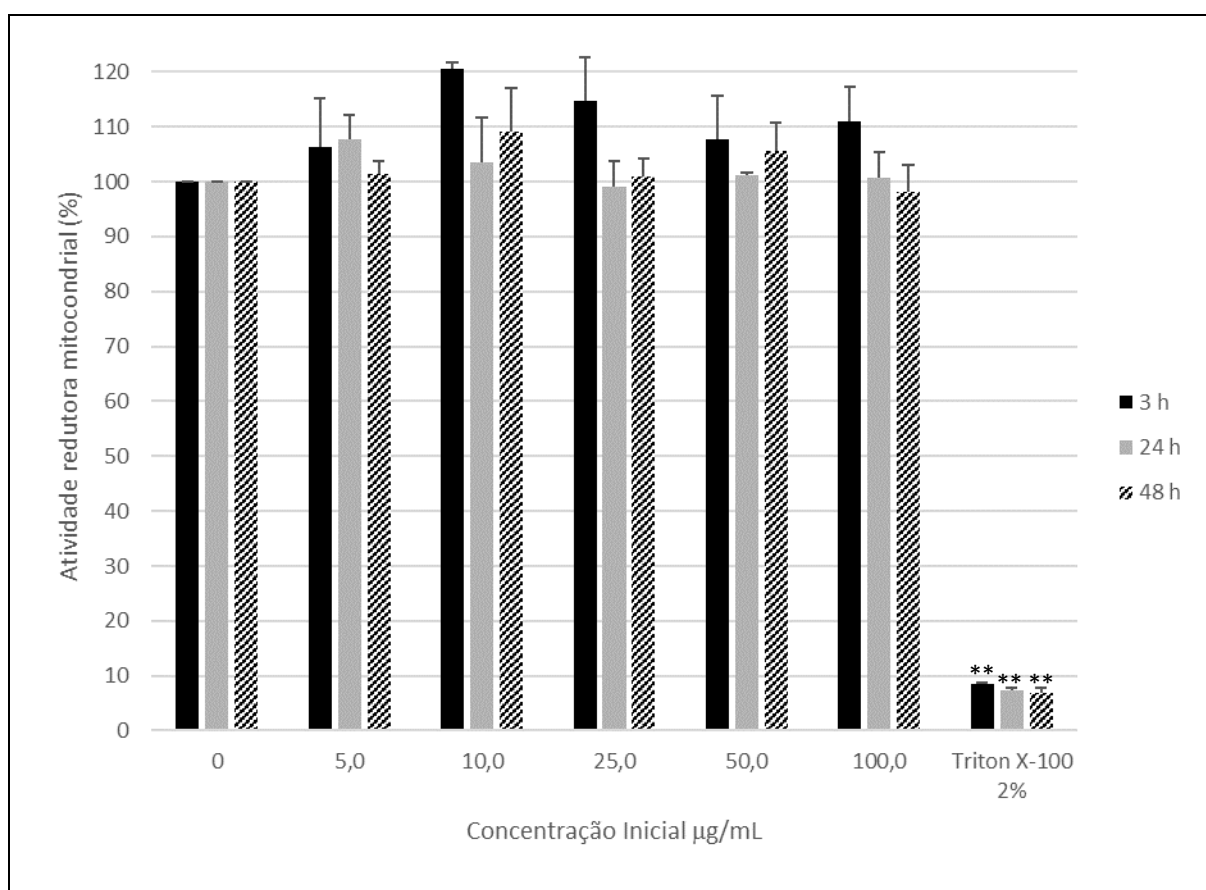


Legenda: (a) número de macrófagos infectados, (b) número de amastigotas infectando macrófagos. Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.2.3 Análise da viabilidade celular pelo teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagens permanentes

Na análise da viabilidade da cultura de macrófagos RAW264,7 (Figura 28) exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13, por teste colorimétrico WST-1, que analisa a interferência no funcionamento normal das mitocôndrias das células, o tratamento não induziu danos às células, independente de concentração e tempo de exposição, por esse método.

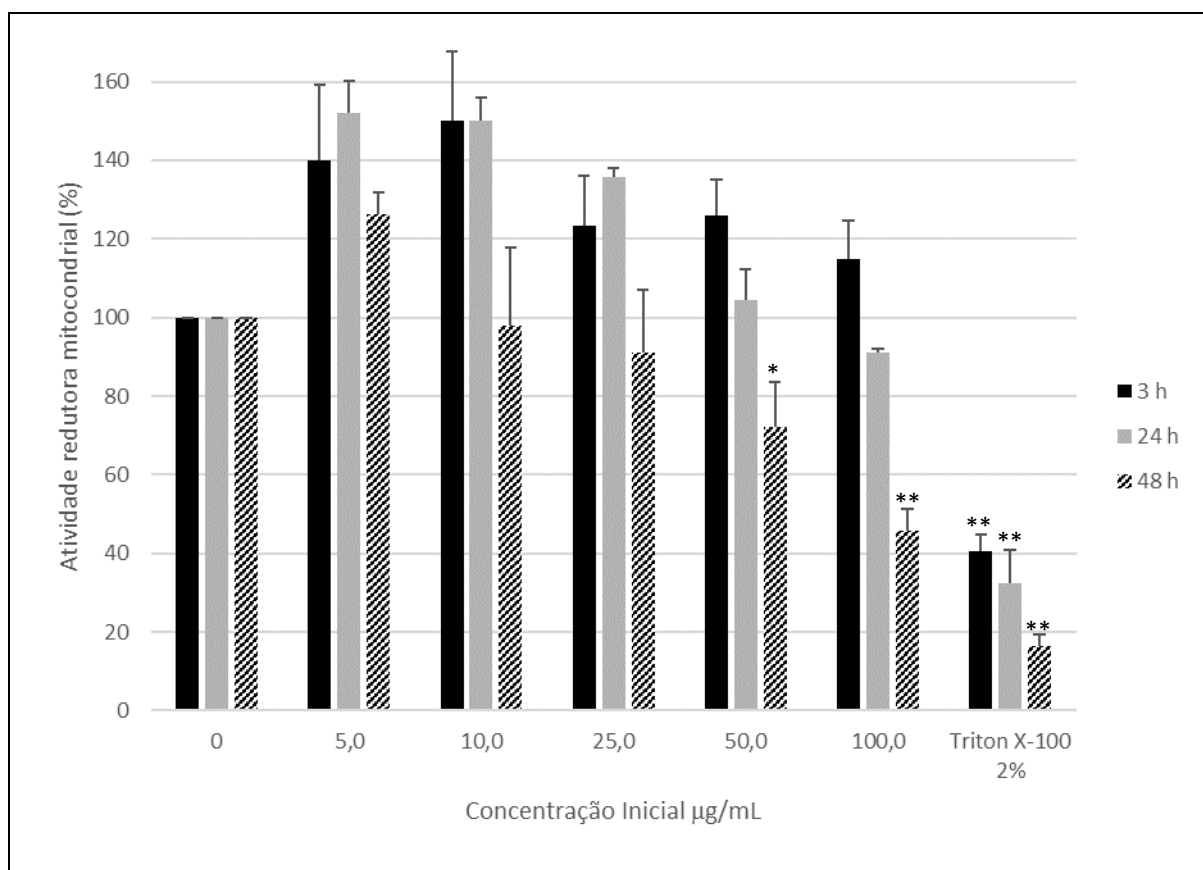
Figura 28: Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.



Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

Na análise da viabilidade da cultura de hepatocarcinoma humano HepG2 exposta ao tratamento (Figura 29), observou-se dano dose-dependente às células, com diferença estatística significativa, nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, depois de 48 h de exposição, por esse método.

Figura 29: Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.

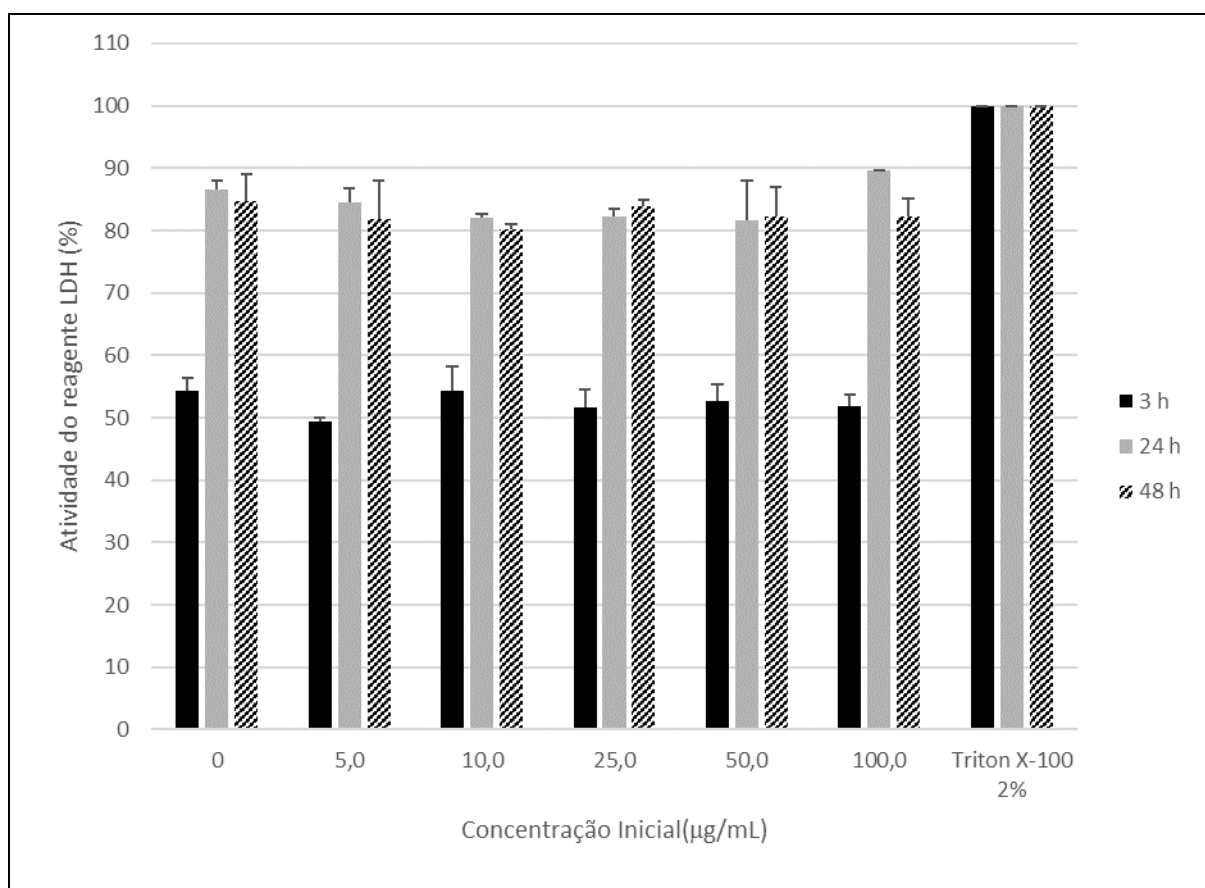


Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.2.4 Análise da atividade citotóxica pelo teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagens permanentes

Na análise da atividade citotóxica da cultura de macrófagos RAW 264,7 exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13 (Figura 30), por teste colorimétrico LDH, que analisa a integridade da membrana plasmática das células, o tratamento não induziu danos, independente de concentração e tempo de exposição, por esse método.

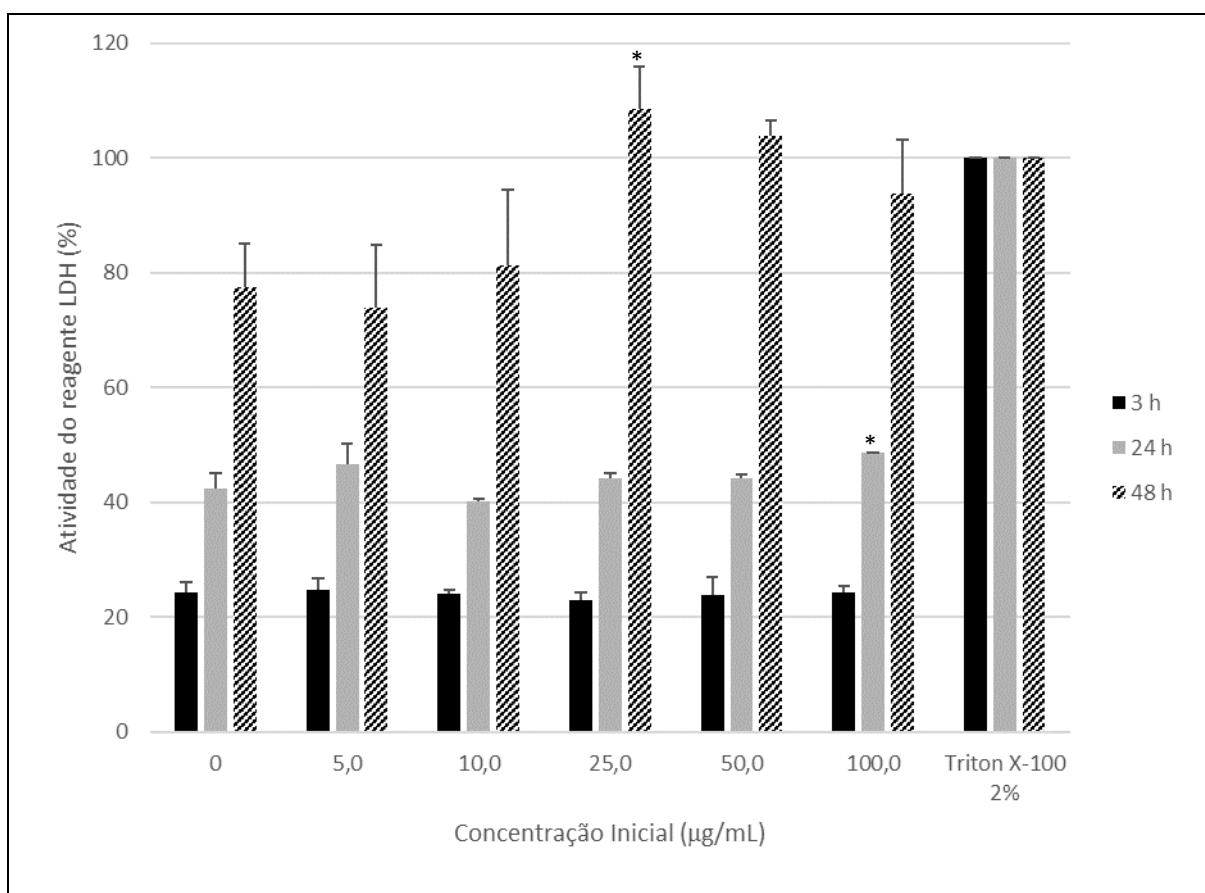
Figura 30: Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.



Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

Na análise da viabilidade da cultura de hepatocarcinoma humano HepG2 (Figura 31), exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13, por teste colorimétrico LDH, observou-se dano dose dependente à membrana plasmática das células, com diferença estatística significativa apenas na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, após 24 h de exposição; e apenas na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, após 48 h de exposição, por esse método.

Figura 31: Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.

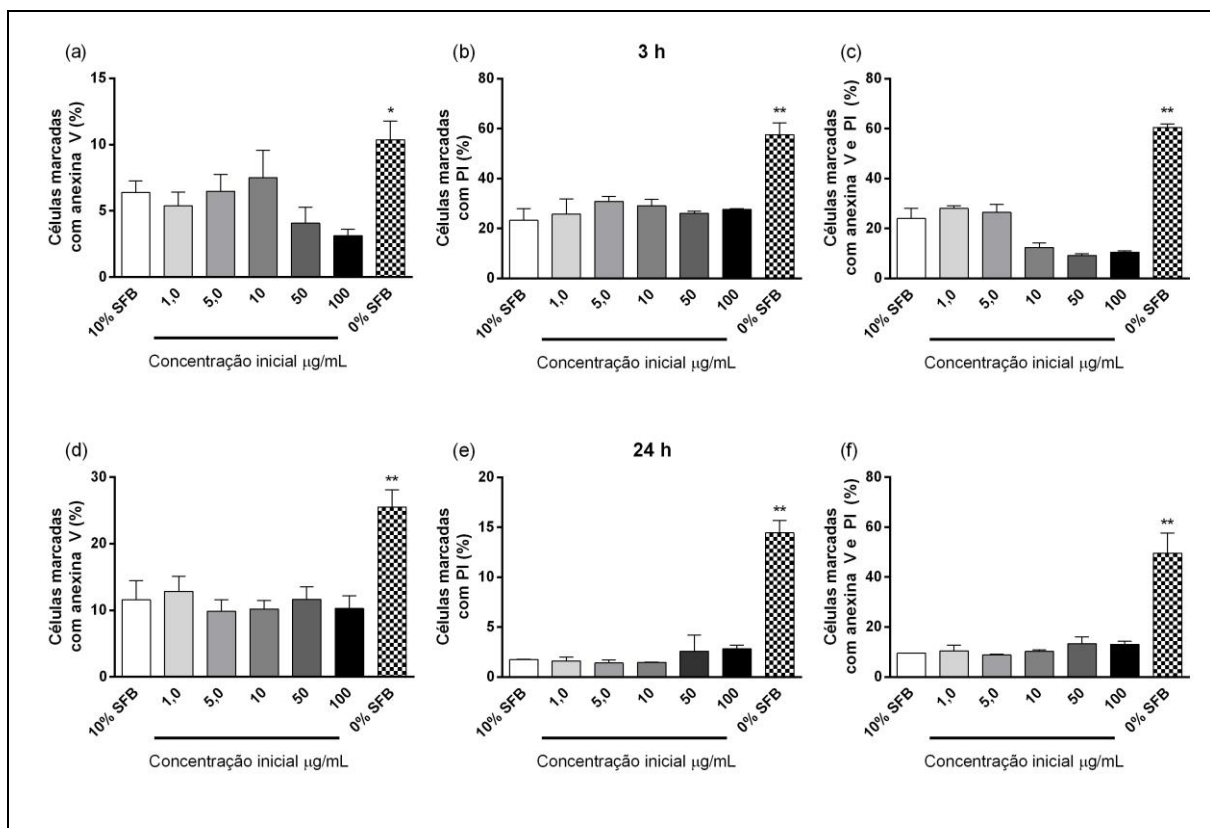


Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.2.5 Análise da indução da apoptose e necrose por citometria de fluxo

Na análise da indução da apoptose, indicada pela ligação da anexina V à fosfatidilserina, e da necrose, indicada pela atividade intercalante do iodeto de propídio, no tratamento da cultura de células de linhagem permanente de macrófagos RAW 264,7 com o derivado PNING 47-13 (Figura 32), por citometria de fluxo, não foram observadas células em estágios iniciais da apoptose (ligadas à anexina V, somente) (Figuras 32a e 32d), em necrose (intercaladas com iodeto de propídio, somente) (Figuras 32b e 32e) ou na fase tardia da apoptose (ligadas à anexina V e intercaladas com iodeto de propídio, ao mesmo tempo) (Figuras 32c e 32e), em nenhuma concentração ou tempo de tratamento.

Figura 32: Análise da indução da apoptose e necrose em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.

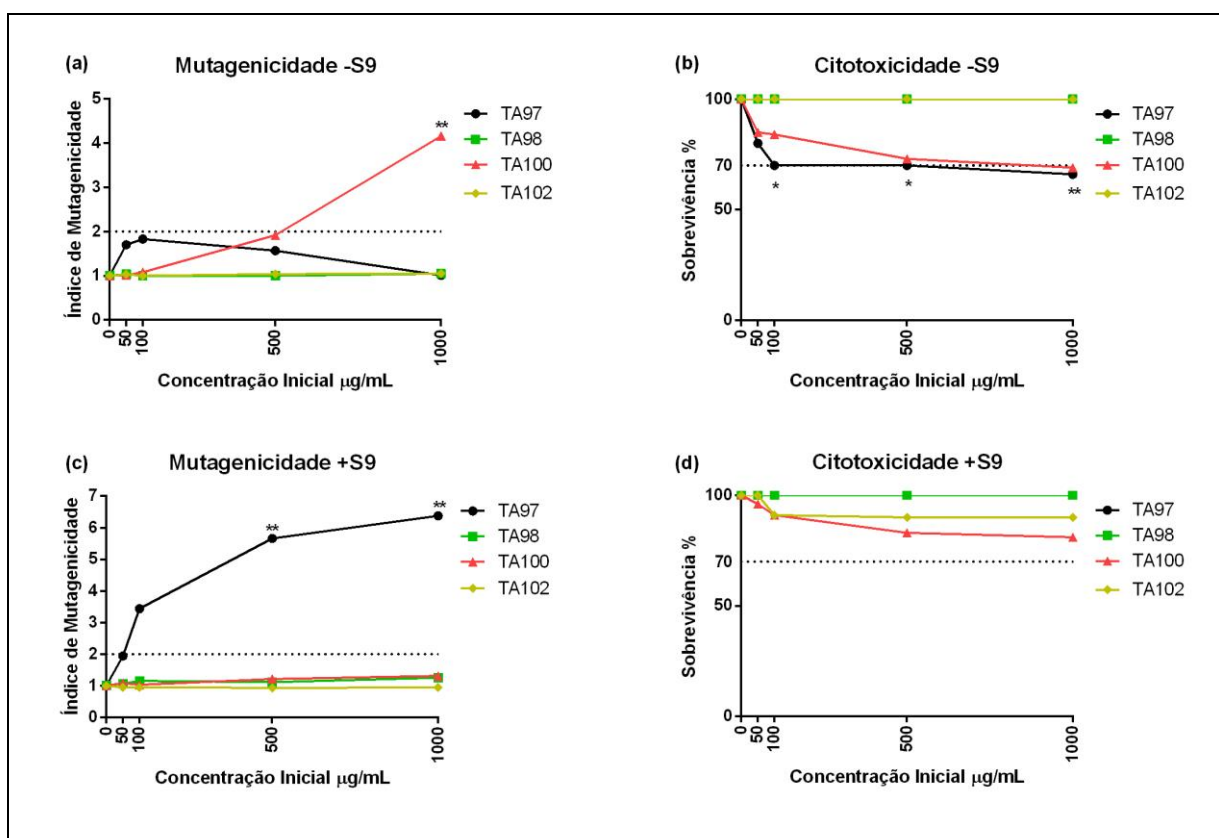


Legenda: (a) percentagem de células marcadas com anexina V após 3 h de tratamento; (b) percentagem de células marcadas com PI após 3 h de tratamento; (c) percentagem de células marcadas com anexina V e PI após 3 h de tratamento; (d) percentagem de células marcadas com anexina V após 24 h de tratamento; (e) percentagem de células marcadas com PI após 24 h de tratamento; (f) percentagem de células marcadas com anexina V e PI após 24 h de tratamento. Valores percentuais expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo (10% SFB). PI = iodeto de propídio; SFB = soro fetal bovino.

4.2.6 Análise da mutagenicidade pelo teste *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102

Na análise da mutagenicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 47-13 (Figura 33), pelo teste *Salmonella*/microsoma, observou-se a atividade mutagênica dose-dependente, por substituição de pares de bases C-G, no tratamento da linhagem TA100 (1000 µg/mL), com diferença estatística significativa, na ausência de S9 mix (Figura 33a). Em paralelo, observou-se a atividade citotóxica no tratamento da linhagem TA97 (1000 µg/mL), com diferença significativa, na ausência de S9 mix (Figura 33b). Além disso, observou-se atividade mutagênica dose-dependente, por alteração no quadro de leitura (deleção de pares de bases G-C), no tratamento da TA97 (500 e 1000 µg/mL), com diferença estatística significativa, na presença de S9 mix (Figura 33c). Nenhuma alteração significativa da sobrevivência foi observada nas linhagens testadas com as concentrações utilizadas, na presença de S9 mix (Figura 33d).

Figura 33: Teste *Salmonella*/microsoma com linhagens de *S. enterica* TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.

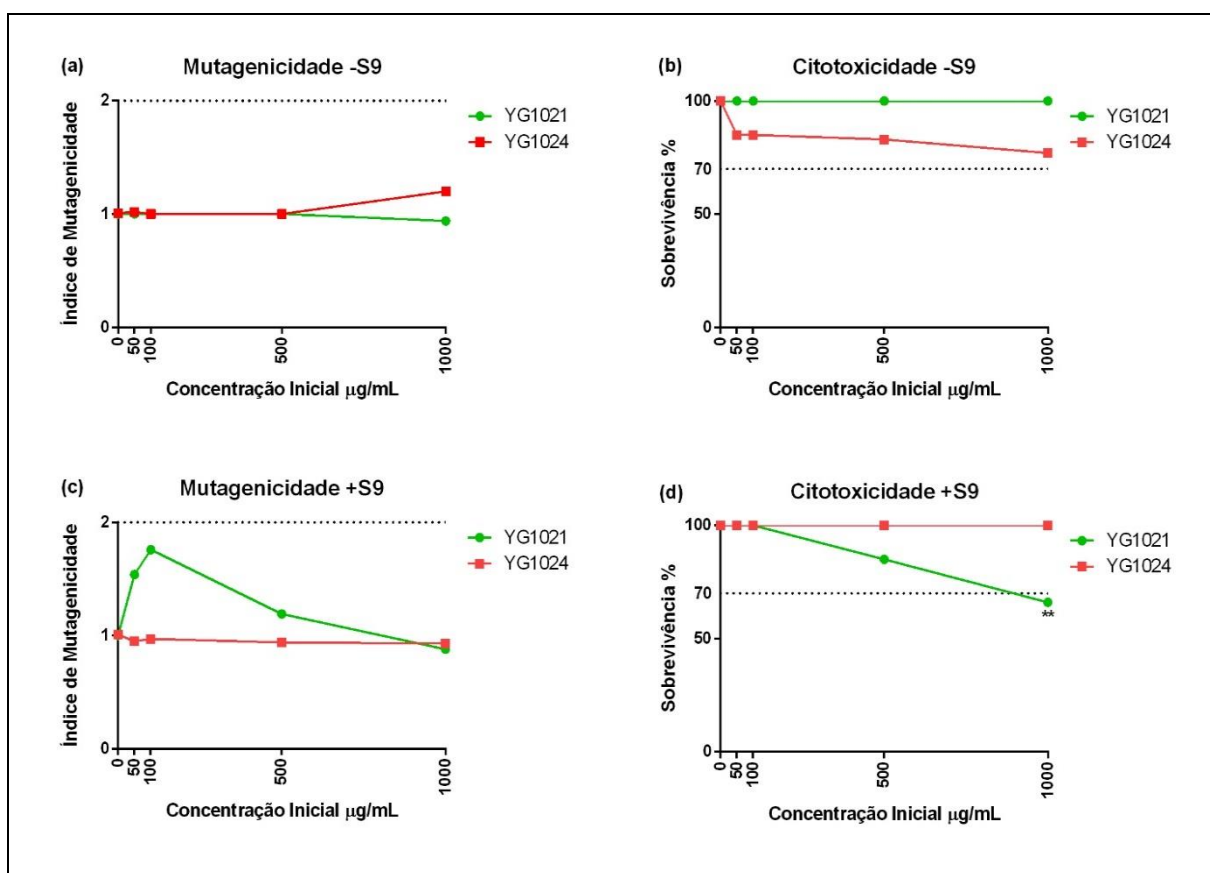


Legenda: (a) mutagenicidade na ausência de S9 mix, (b) citotoxicidade na ausência de S9 mix, (c) mutagenicidade na presença de S9 mix, (d) citotoxicidade na presença de S9 mix. A mutagenicidade é expressa nos valores de índice de mutagenicidade para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. A citotoxicidade é expressa nos valores percentuais de sobrevivência para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. Diferença estatística significativa dos resultados (índice de mutagenicidade ≥ 2 ; Sobrevivência $< 70\%$) na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.2.7 Análise da mutagenicidade pelo teste *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens YG1021 e YG1024

Na análise da mutagenicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 47-13 (Figura 34), utilizando linhagens de *S. enterica* YG1021 e YG1024, não foi observada a atividade mutagênica no tratamento das linhagens, independente de metabolização exógena (Figuras 34a e 34c). No entanto, observou-se a atividade citotóxica, na presença de S9 mix, somente no tratamento da linhagem YG1021 (1000 µg/mL), com diferença estatística significativa (Figura 34d), porém nenhum efeito na ausência de S9 mix (Figura 34b).

Figura 34: Teste *Salmonella*/microsoma com linhagens de *S. enterica* YG1021 e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.

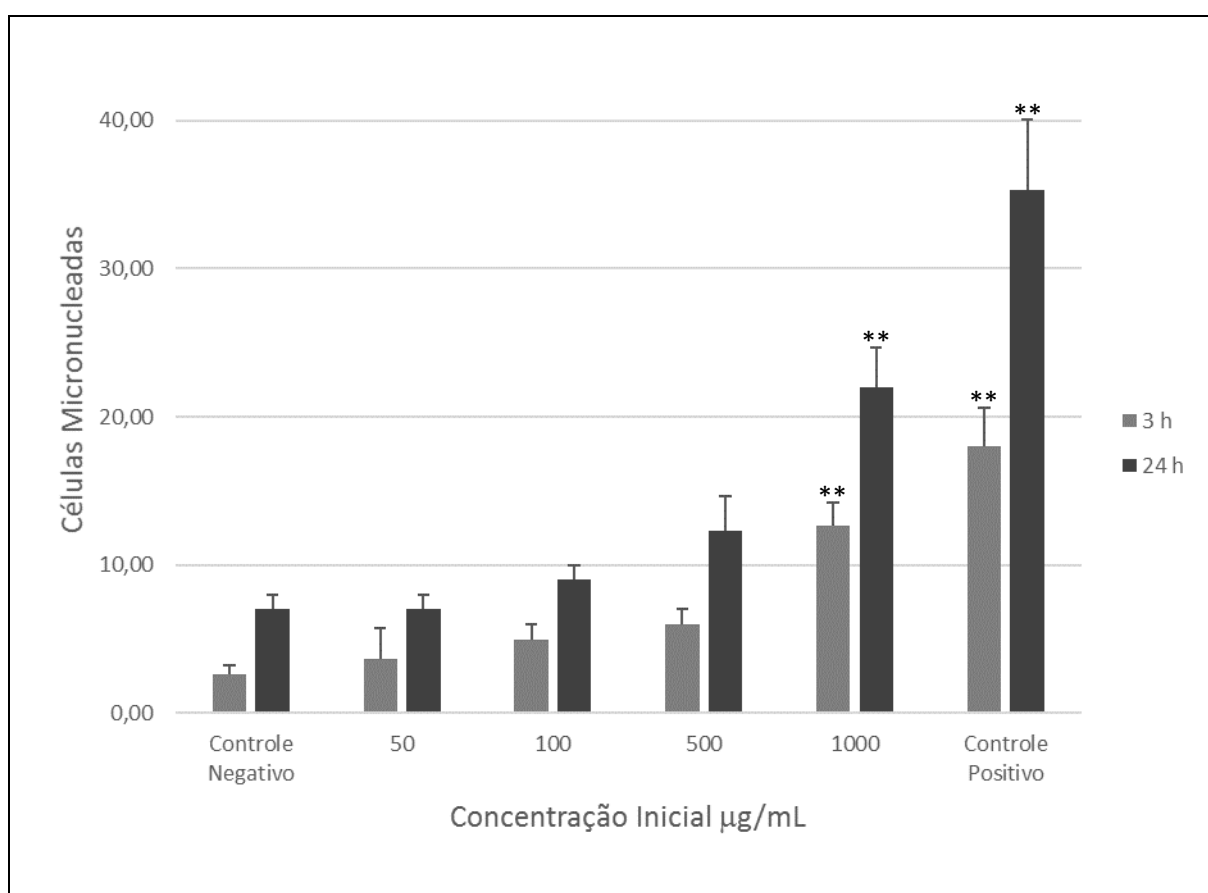


Legenda: (a) mutagenicidade na ausência de S9 mix, (b) citotoxicidade na ausência de S9 mix, (c) mutagenicidade na presença de S9 mix, (d) citotoxicidade na presença de S9 mix. A mutagenicidade é expressa nos valores de índice de mutagenicidade para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. A citotoxicidade é expressa nos valores percentuais de sobrevivência para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. Diferença estatística significativa dos resultados (índice de mutagenicidade ≥ 2 ; Sobrevivência $< 70\%$) na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.2.8 Análise da genotoxicidade pelo teste do micronúcleo em cultura de células de linhagens permanentes

Na análise da genotoxicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 47-13 (Figura 35), na formação de células micronucleadas, utilizando cultura de células de macrófago RAW 264,7, observou-se a atividade genotóxica dose-dependente, com diferença estatística significativa, apenas na maior concentração (1000 µg/mL), tanto no tratamento de 3 h quanto de 24 h.

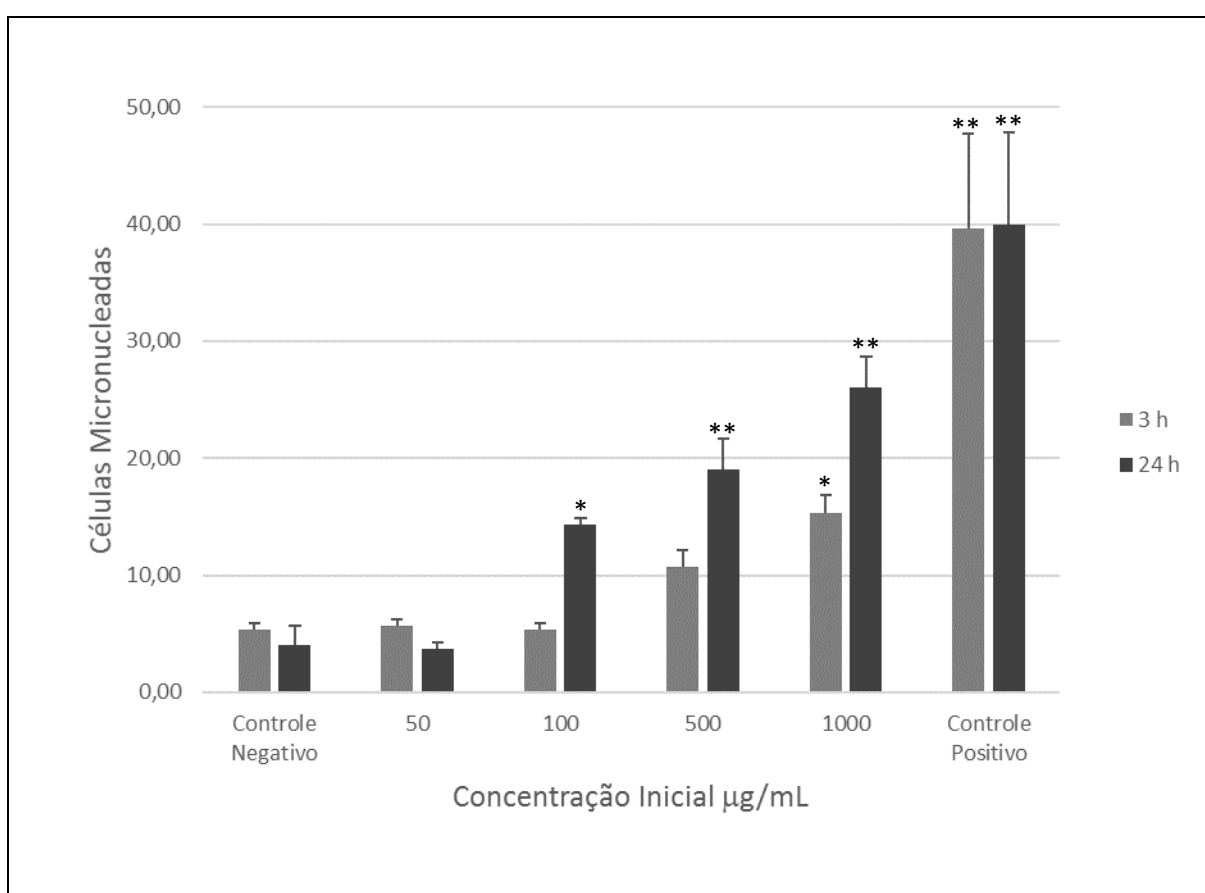
Figura 35: Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.



Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

Na análise da genotoxicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 47-13 (Figura 36), utilizando cultura de hepatocarcinoma humano HepG2, observou-se a atividade genotóxica dose-dependente, com diferença estatística significativa, apenas na maior concentração (1000 $\mu\text{g/mL}$), após 3 h de tratamento; e atividade genotóxica dose-dependente, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, após 24 h de tratamento.

Figura 36: Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.

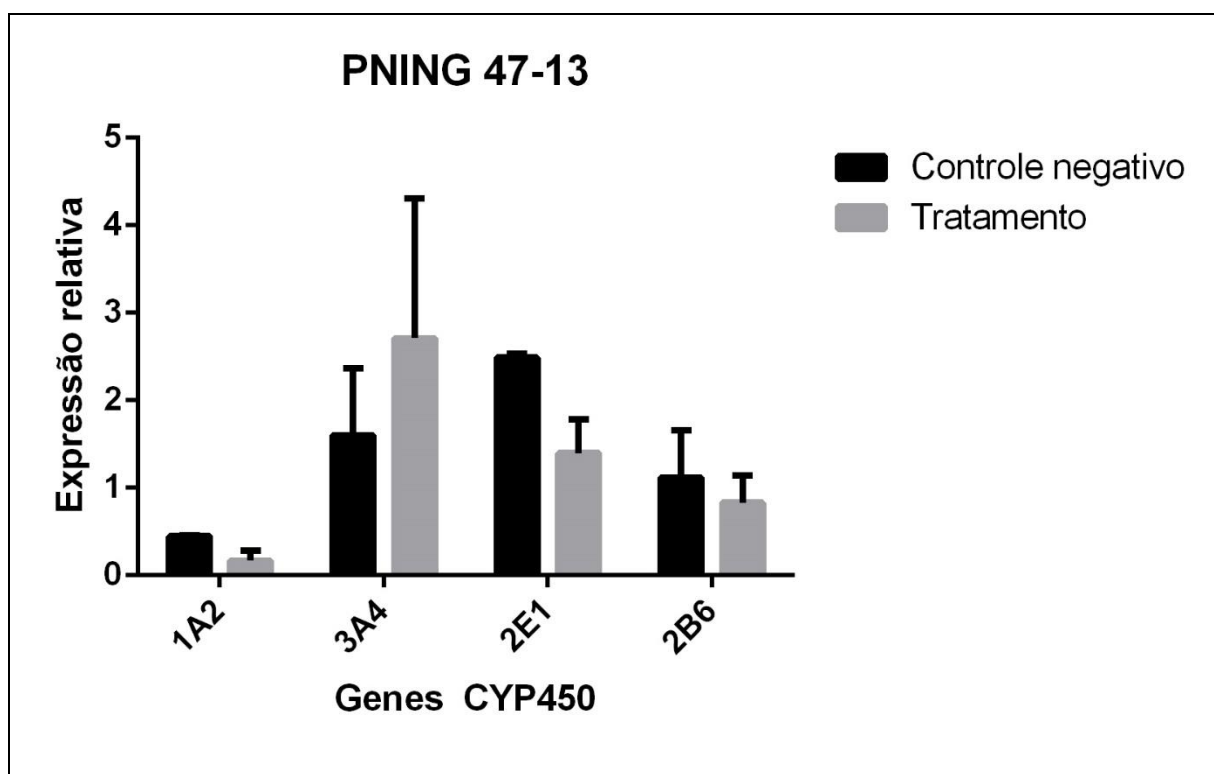


Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.2.9 Análise da expressão relativa de genes do citocromo P450 pela reação em cadeia da polimerase

Na análise da expressão de genes do citocromo P450 de cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2 (Figura 37), responsáveis pela metabolização de xenobióticos, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13 (100 µg/mL), observou-se a indução da expressão dos genes das subfamília CYP3A4, e a inibição das subfamílias CYP1A2, 2E1 e 2B6, em relação ao controle negativo.

Figura 37: Expressão relativa de genes do citocromo P450 de cultura de células de linhagem permanente hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 47-13.



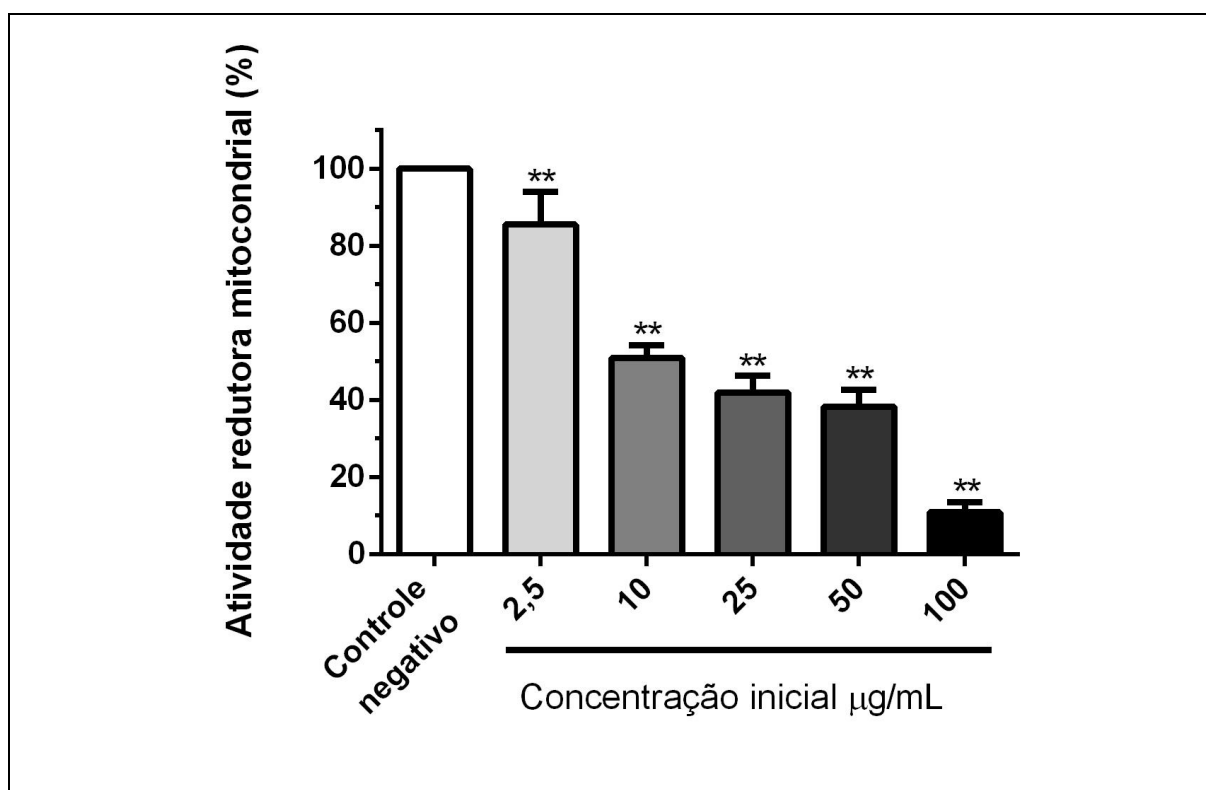
Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados no teste de *t* de Student quando * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.3 PNING 39-14

4.3.1 Análise da atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y

Na análise da atividade tripanocida do nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 38), no tratamento do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, na fase evolutiva amastigota axênica, observou-se a diminuição dose-dependente da viabilidade celular nessas células, pelo teste colorimétrico MTT, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 2,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$, com redução máxima de aproximadamente 90%.

Figura 38: Atividade tripanocida em forma evolutiva amastigota axênica de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.

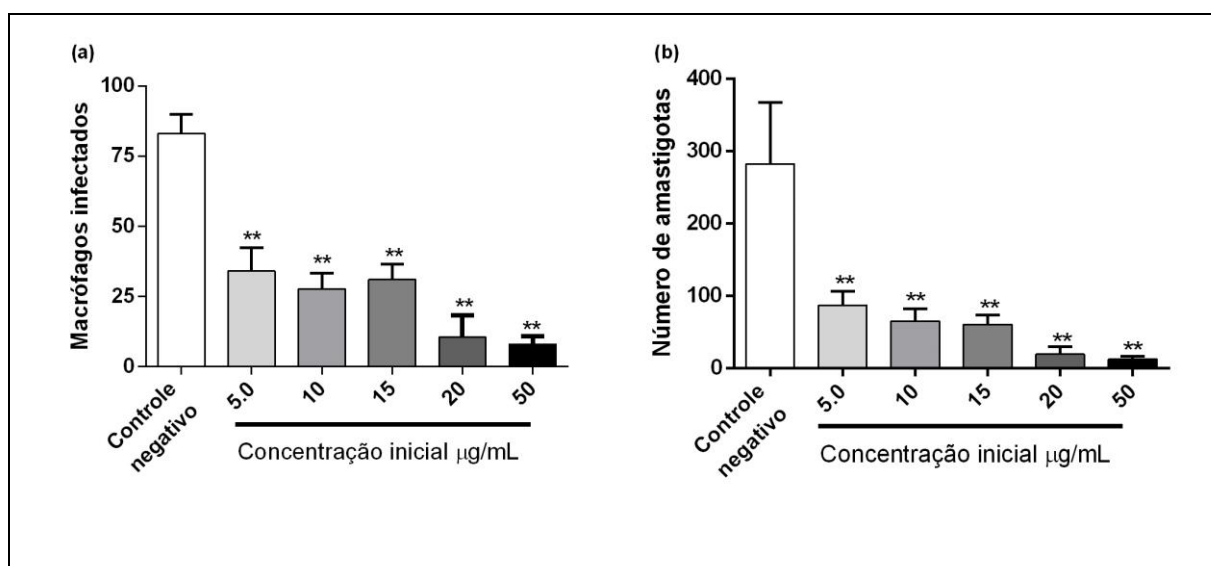


Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de quintuplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.3.2 Análise da atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y

Na análise da atividade tripanocida do nitro-heterocíclico PNING 39-14 (Figura 39) no tratamento de macrófagos peritoneais infectados por *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, fase evolutiva amastigota, observou-se: a diminuição dose-dependente da população de macrófagos infectados, com diferença estatística significativa, em todas as concentrações utilizadas (5,0 a 50 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 39a); a diminuição dose-dependente da população de *T. cruzi* no interior dos macrófagos (infectados), com diferença estatística significativa, em todas as concentrações utilizadas (5,0 a 50 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 39b).

Figura 39: Atividade tripanocida em macrófagos peritoneais infectados com forma evolutiva amastigota de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, expostos ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.

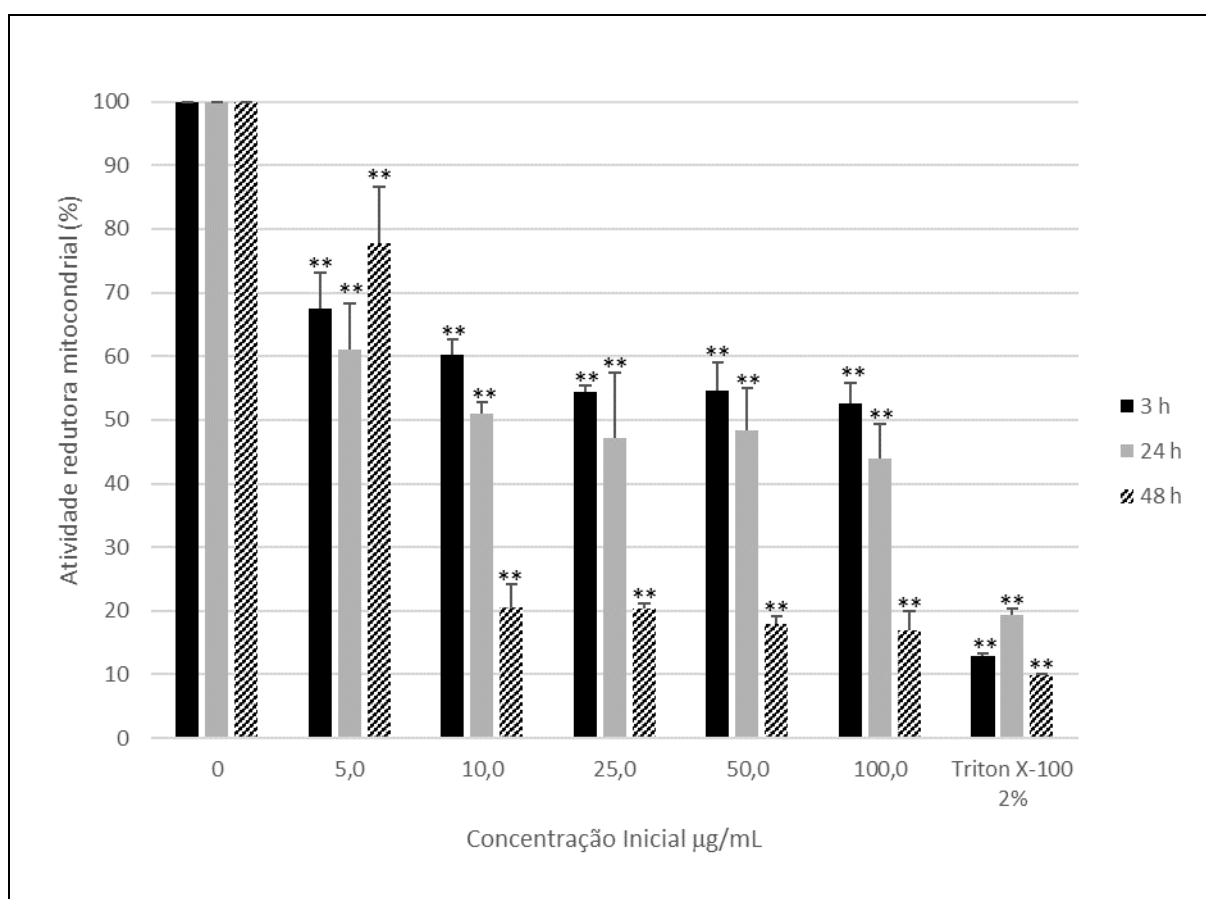


Legenda: (a) número de macrófagos infectados, (b) número de amastigotas infectando macrófagos. Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.3.3 Análise da viabilidade celular pelo teste colorimétrico WST-1 em cultura de células linhagens permanentes

Na análise da viabilidade da cultura de macrófagos RAW264,7 exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14 (Figura 40), por teste colorimétrico WST-1, que analisa a interferência no funcionamento normal das mitocôndrias das células, todos os tratamentos e tempos de exposição induziram danos dose-dependente às células, com diferença estatística significativa, por esse método.

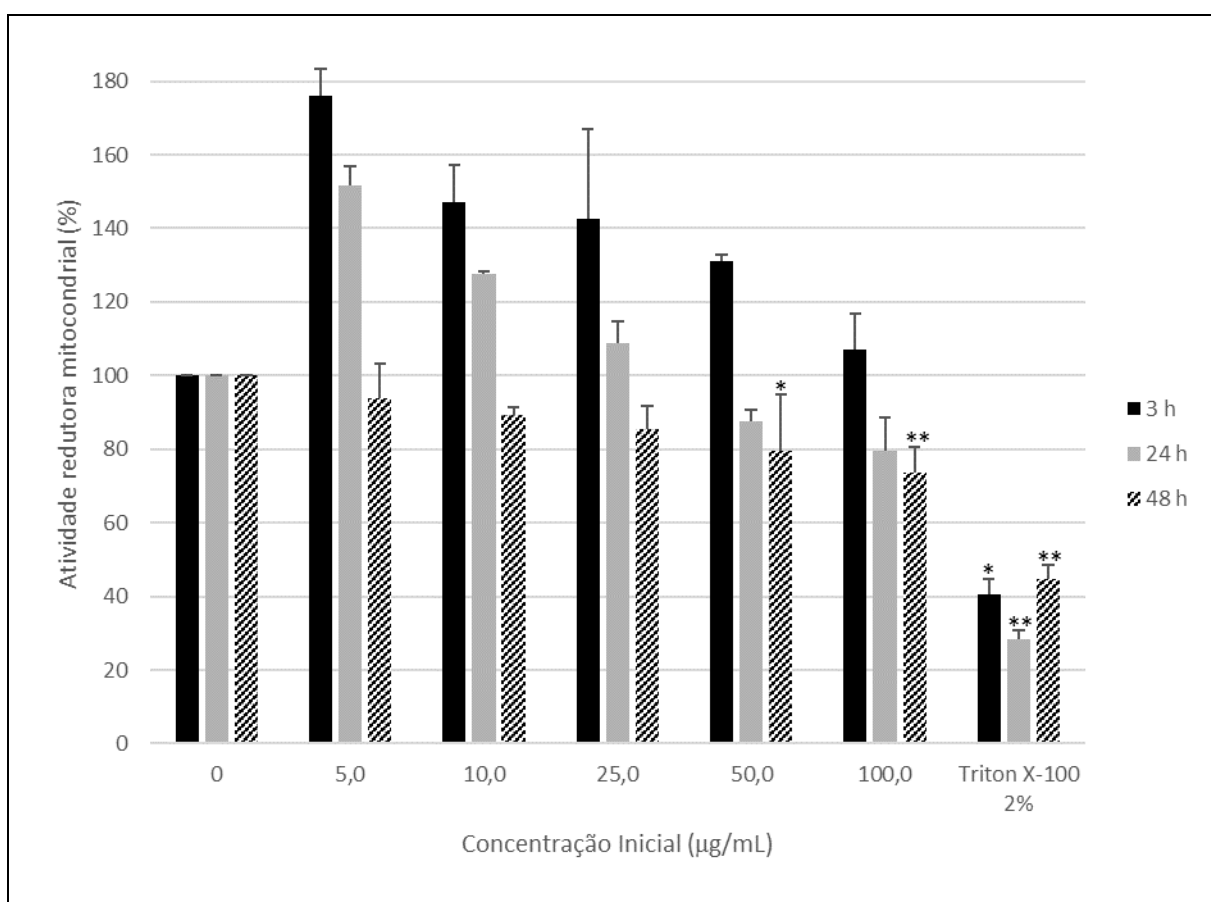
Figura 40: Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de macrófagos RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.



Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

Na análise da viabilidade da cultura de hepatocarcinoma humano HepG2 exposta ao tratamento (Figura 41), observou-se dano dose-dependente às células, com diferença estatística significativa, nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, depois de 48 h de exposição, por esse método.

Figura 41: Teste colorimétrico WST-1 em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.

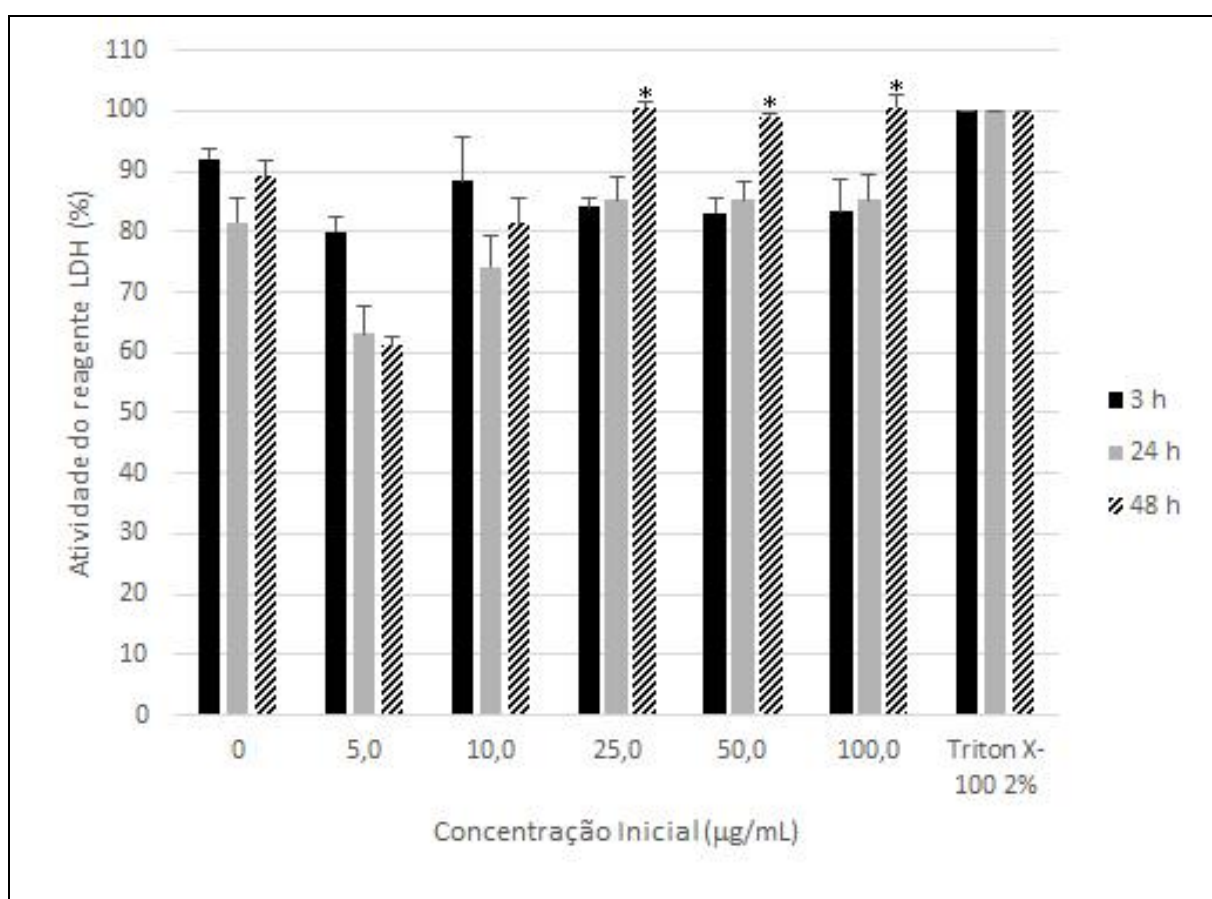


Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.3.4 Análise da atividade citotóxica pelo teste colorimétrico LDH em cultura de células linhagens permanentes

Na análise da atividade citotóxica de macrófagos RAW 264,7 exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14 (Figura 42), por teste colorimétrico LDH, que analisa a integridade da membrana plasmática das células, o tratamento induziu dano dose-dependente às células, nas concentrações de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$, no tempo de exposição de 24 h, com diferença estatística significativa, por esse método.

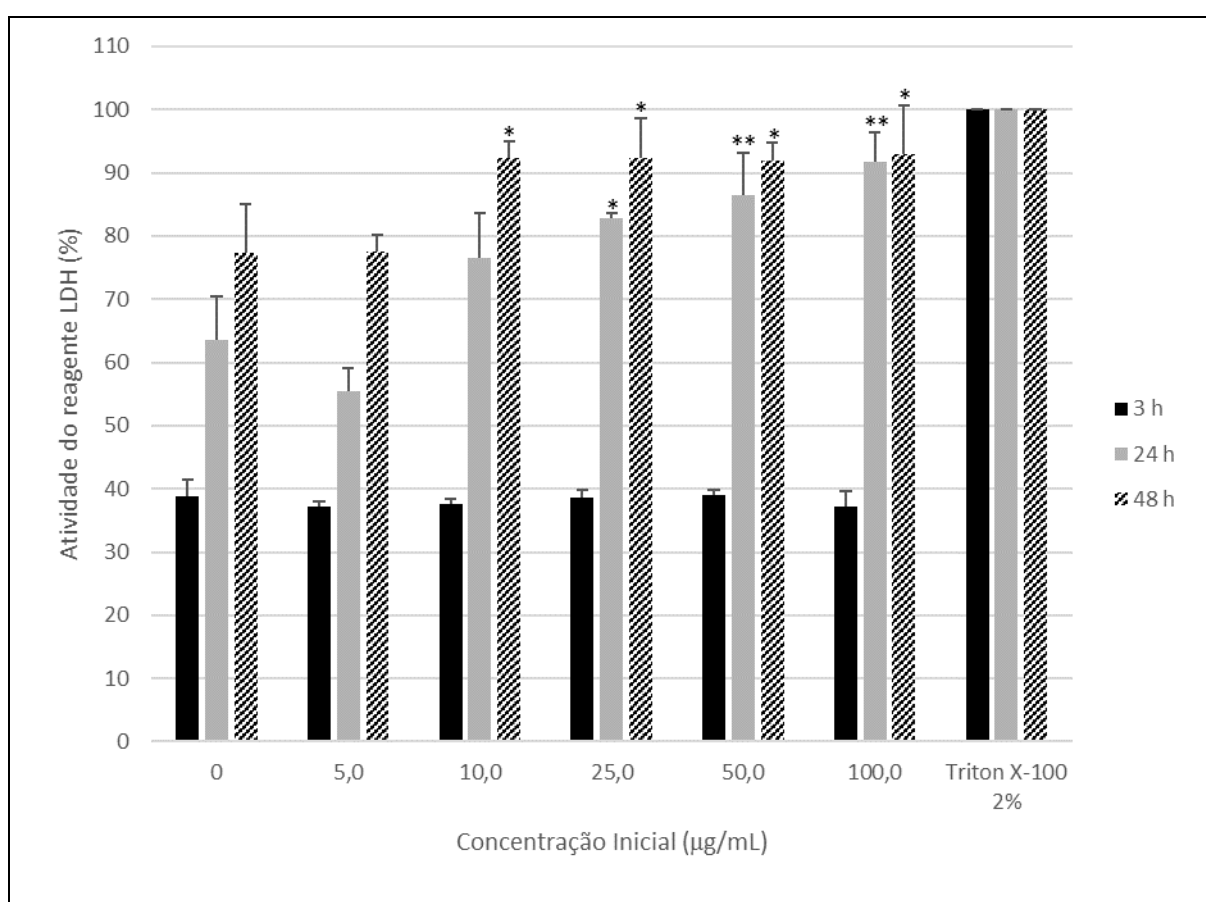
Figura 42: Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.



Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

Na análise da viabilidade da cultura de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14 (Figura 43), por teste colorimétrico LDH, o tratamento induziu dano dose-dependente à membrana plasmática das células nas concentrações de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$, no tempo de exposição de 24 h, com diferença estatística significativa; e dano nas concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, no tempo de exposição de 48 h, com diferença estatística significativa, por esse método.

Figura 43: Teste colorimétrico LDH em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.

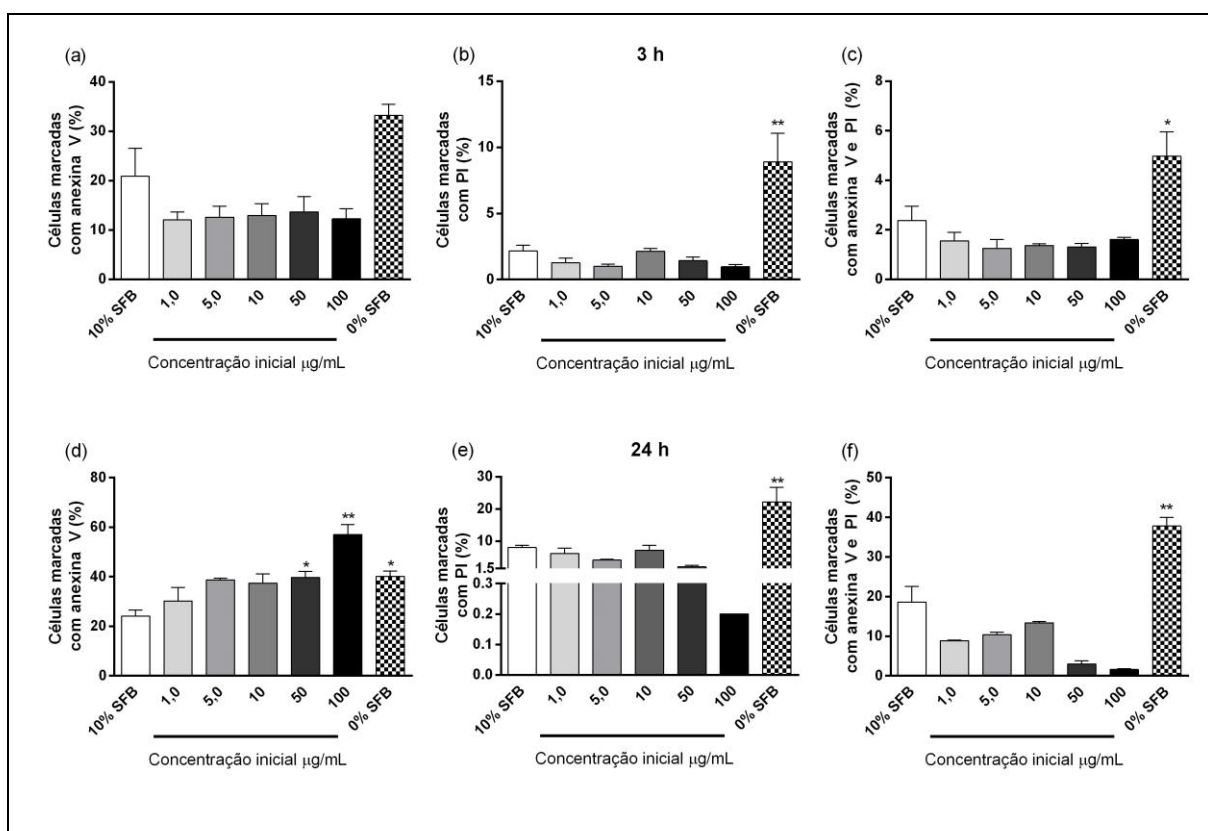


Legenda: Valores percentuais expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.3.5 Análise da indução da apoptose e necrose por citometria de fluxo

Na análise da indução da apoptose, indicada pela ligação da anexina V à fosfatidilserina, e da necrose, indicada pela atividade intercalante do iodeto de propídio, no tratamento de cultura de células de linhagem permanente de macrófagos RAW 264,7 com o derivado PNING 39-14 (Figura 44), por citometria de fluxo, observou-se células em estágios iniciais da apoptose (ligadas à anexina V, somente), nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, com diferença estatística significativa, após 24 h de exposição (Figura 44d).

Figura 44: Análise da indução da apoptose e necrose em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.

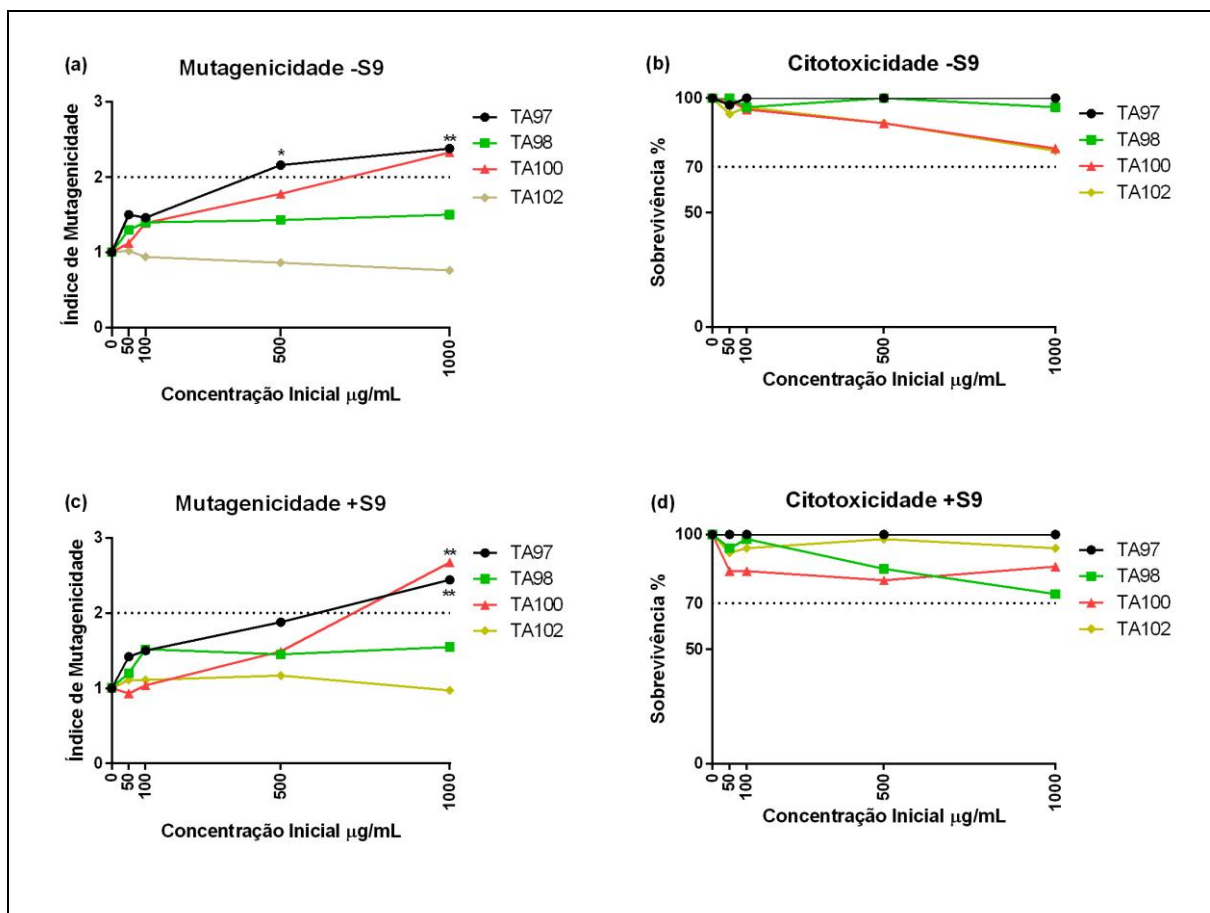


Legenda: (a) percentagem de células marcadas com anexina V após 3 h de tratamento; (b) percentagem de células marcadas com PI após 3 h de tratamento; (c) percentagem de células marcadas com anexina V e PI após 3 h de tratamento; (d) percentagem de células marcadas com anexina V após 24 h de tratamento; (e) percentagem de células marcadas com PI após 24 h de tratamento; (f) percentagem de células marcadas com anexina V e PI após 24 h de tratamento. Valores percentuais expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo (10% SFB). PI = iodeto de propídio; SFB = soro fetal bovino.

4.3.6 Análise da mutagenicidade pelo teste *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102

Na análise da mutagenicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 39-14 (Figura 45), pelo teste *Salmonella*/microsoma, observou-se a atividade mutagênica dose-dependente, por alteração do quadro de leitura (deleção de pares de base G-C), no tratamento da linhagem TA97 (500 e 1000 µg/mL), com diferença estatística significativa; e por substituição de pares de bases G-C, no tratamento da linhagem TA100 (1000 µg/mL), na ausência de S9 mix (Figura 45a). Além disso, observou-se a atividade mutagênica dose-dependente, por alteração do quadro de leitura (deleção de pares de base G-C), no tratamento das linhagens TA97 (1000 µg/mL); e por substituição de pares de bases G-C, no tratamento da linhagem TA100 (1000 µg/mL), com diferença estatística significativa, na presença de S9 mix (Figura 45c). Não foi observada a atividade citotóxica no tratamento das linhagens, independente da presença de metabolização exógena (Figuras 45b e 45d).

Figura 45: Teste *Salmonella*/microsoma com linhagens de *S. enterica* TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.

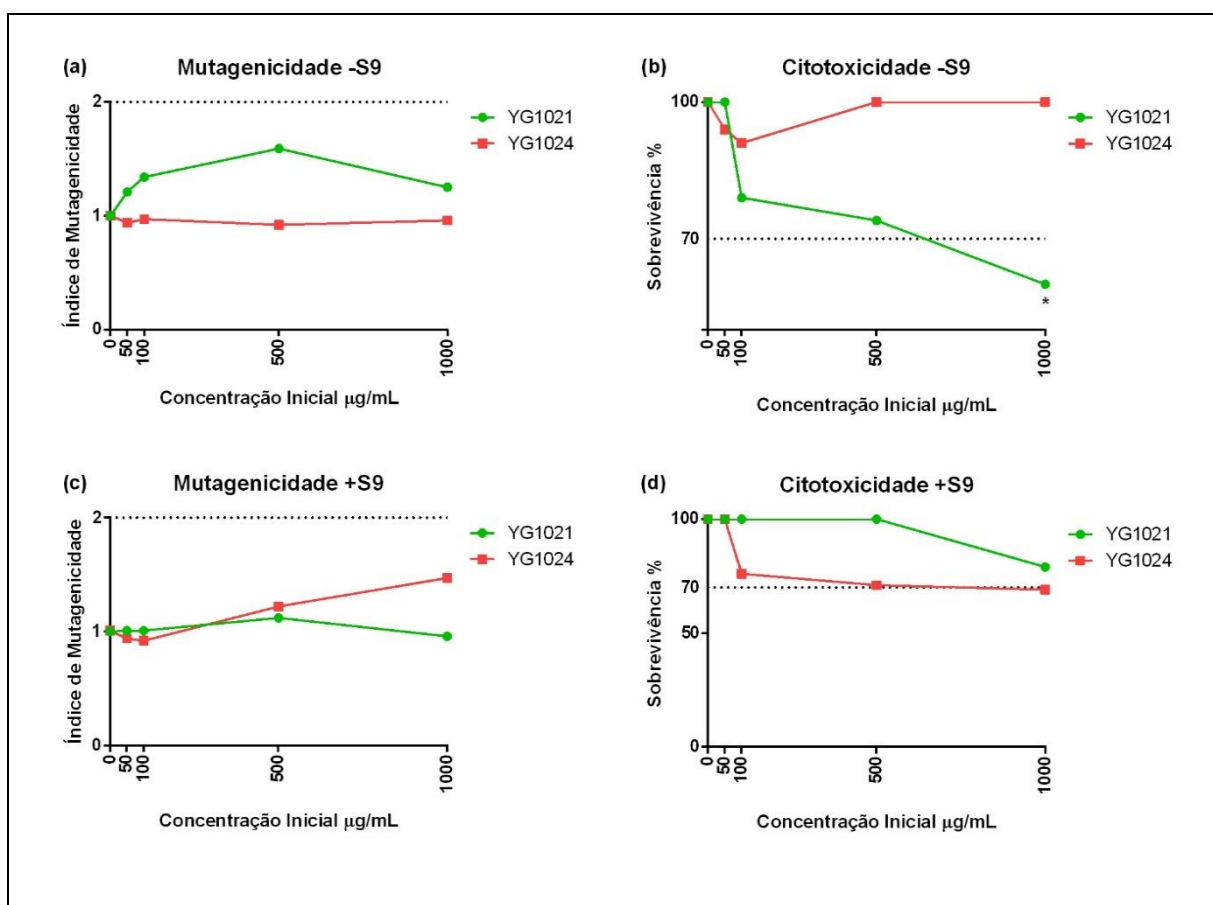


Legenda: (a) mutagenicidade na ausência de S9 mix, (b) citotoxicidade na ausência de S9 mix, (c) mutagenicidade na presença de S9 mix, (d) citotoxicidade na presença de S9 mix. A mutagenicidade é expressa nos valores de índice de mutagenicidade para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. A citotoxicidade é expressa nos valores percentuais de sobrevivência para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. Diferença estatística significativa dos resultados (índice de mutagenicidade ≥ 2 ; Sobrevivência $< 70\%$) na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.3.7 Análise da mutagenicidade pelo teste *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) utilizando linhagens YG1021 e YG1024

Na análise da mutagenicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 39-14 (Figura 46), utilizando linhagens de *Salmonella enterica* YG1021 e YG1024, não foi observada a atividade mutagênica no tratamento das linhagens, independente de metabolização exógena (Figuras 46a e 46c). No entanto, observou-se a atividade citotóxica, somente na ausência de S9 mix, no tratamento da linhagem YG1021 (1000 µg/mL), com diferença estatística significativa (Figura 46b).

Figura 46: Teste *Salmonella*/microsoma com linhagens de *S. enterica* YG1021 e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, expostas ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.

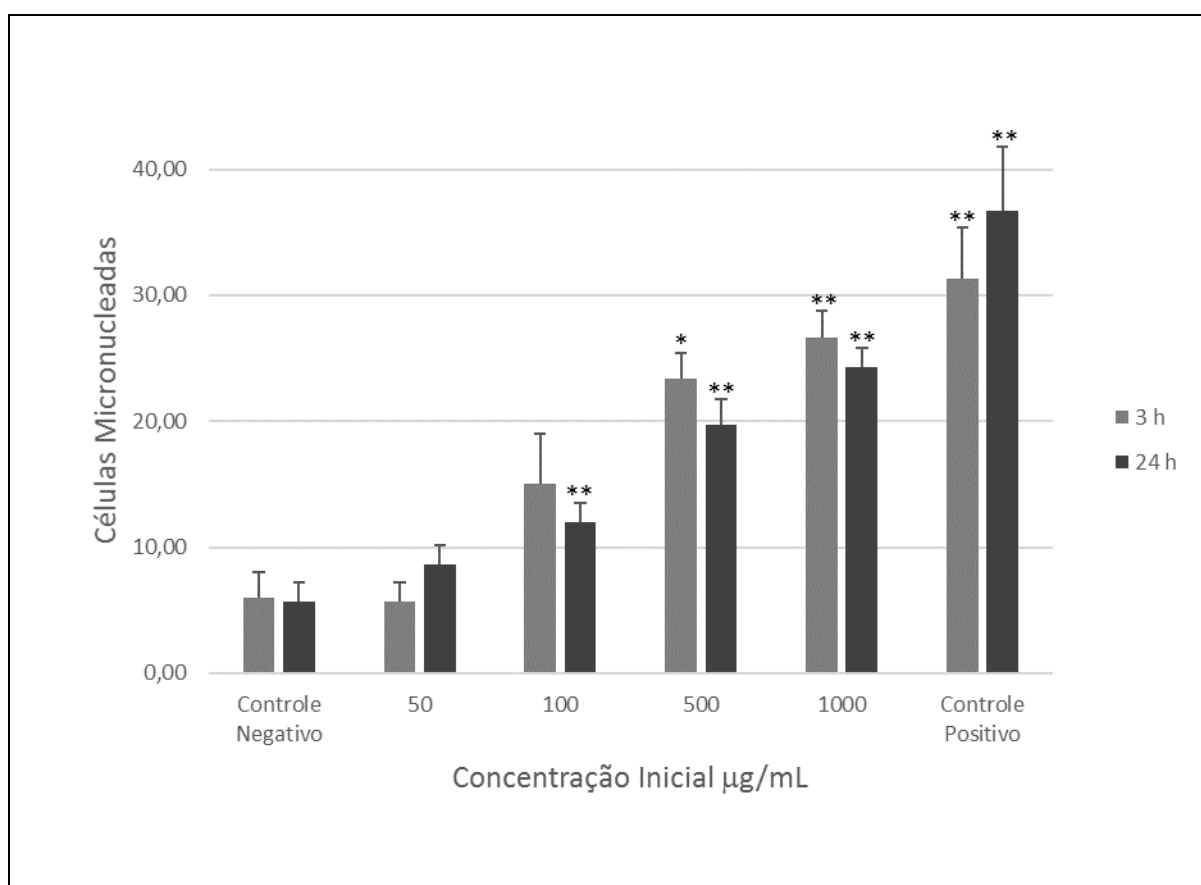


Legenda: (a) mutagenicidade na ausência de S9 mix, (b) citotoxicidade na ausência de S9 mix, (c) mutagenicidade na presença de S9 mix, (d) citotoxicidade na presença de S9 mix. A mutagenicidade é expressa nos valores de índice de mutagenicidade para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. A citotoxicidade é expressa nos valores percentuais de sobrevivência para cada concentração inicial utilizada do nitro-heterocíclico. Diferença estatística significativa dos resultados (índice de mutagenicidade ≥ 2 ; Sobrevivência $< 70\%$) na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.3.8 Análise da genotoxicidade pelo teste do micronúcleo em cultura de células de linhagens permanentes

Na análise da genotoxicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 39-14 (Figura 47), na formação de células micronucleadas, utilizando cultura de células de macrófago RAW 264,7, observou-se a atividade genotóxica dose dependente, com diferença estatística significativa, nas maiores concentrações (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), após 3 h de tratamento; e atividade genotóxica dose dependente, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, após 24 h de tratamento.

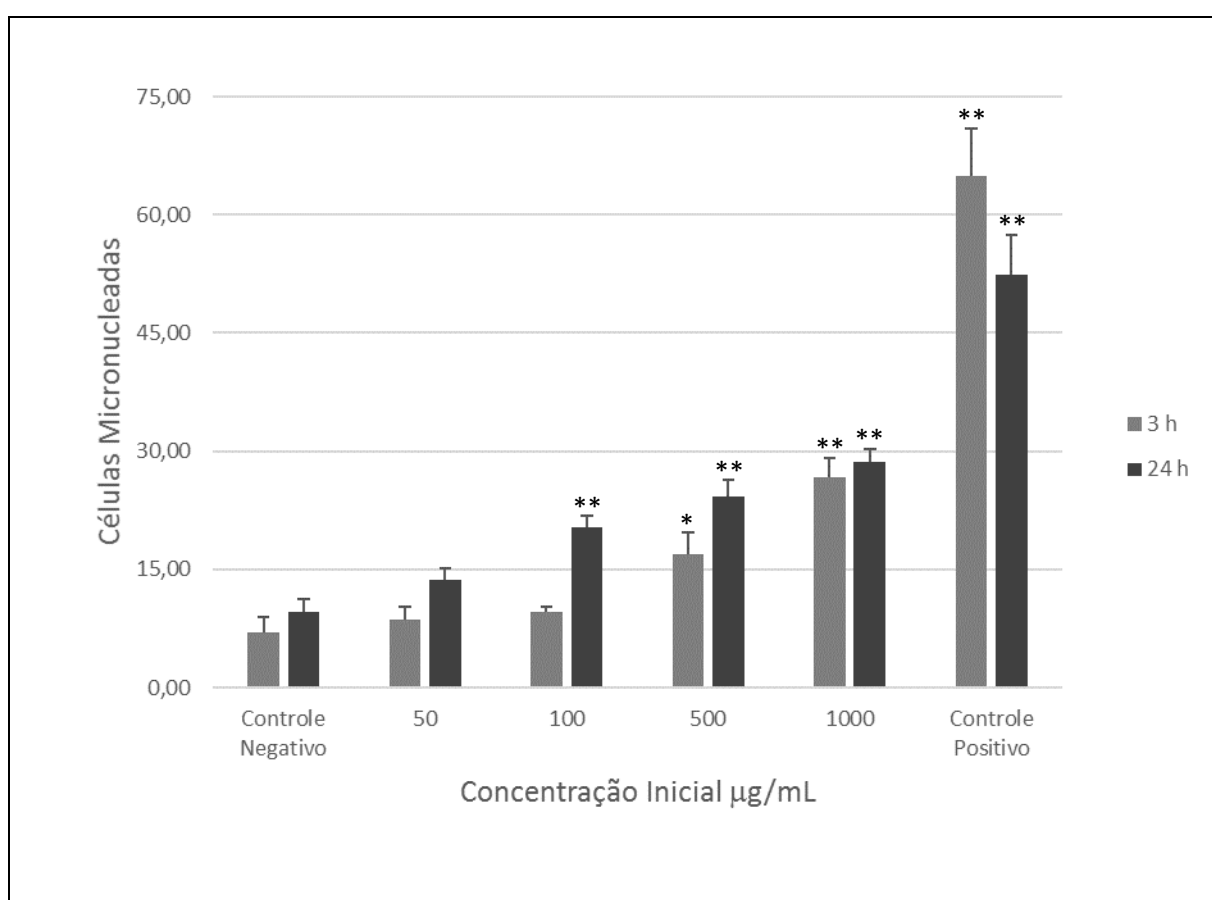
Figura 47: Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de macrófago RAW 264,7, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.



Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

Na análise da genotoxicidade do derivado nitro-heterocíclico PNING 39-14 (Figura 48), utilizando cultura de hepatocarcinoma humano HepG2, observou-se a atividade genotóxica dose-dependente, com diferença estatística significativa, nas maiores concentrações (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), após 3 h de tratamento; e atividade genotóxica dose-dependente, com diferença estatística significativa, nas concentrações de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, após 24 h de tratamento.

Figura 48: Teste do micronúcleo em cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.

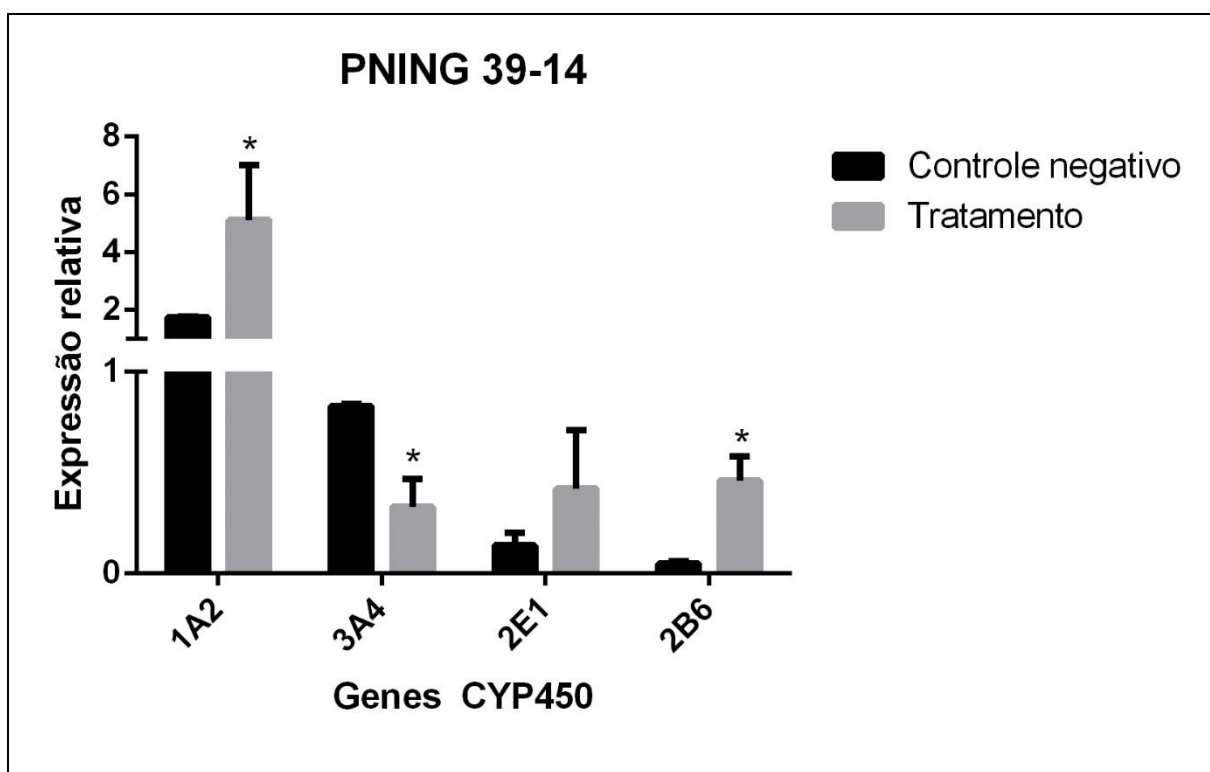


Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados na análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

4.3.9 Análise da expressão relativa de genes do citocromo P450 pela reação em cadeia da polimerase

Na análise da expressão de genes do citocromo P450 de cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2 (Figura 49), responsáveis pela metabolização de xenobióticos, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14 (100 µg/mL), observou-se a indução da expressão dos genes das subfamílias CYP1A2, CYP2E1 e CYP2B6, e a inibição da subfamília CYP3A4, em relação ao controle negativo.

Figura 49: Expressão relativa de genes do citocromo P450 de cultura de células de linhagem permanente de hepatocarcinoma humano HepG2, exposta ao nitro-heterocíclico PNING 39-14.



Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão de triplicatas. Diferença estatística significativa dos resultados no teste de *t* de Student quando * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

5 DISCUSSÃO

A doença de Chagas, assim como outras doenças tropicais infecciosas e negligenciadas, carece de uma solução farmacológica definitiva para seu tratamento. O tratamento atual, benzonidazol, apesar de ser a única opção oficialmente recomendada no Brasil, apresenta variado e controverso potencial curativo, e variada tolerância do tratamento pelos pacientes (MOLINA et al., 2014; DIAS et al., 2016). Por isso, tendo em vista a existência de milhões de pessoas contaminadas pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente infeccioso da doença de Chagas, que já manifestam os severos sintomas da doença ou que são portadoras do protozoário (fase assintomática), é urgente o desenvolvimento de substâncias inéditas para o tratamento e/ou a utilização de novas estratégias de pesquisa, como o redirecionamento de substâncias já existentes, entre outras sugestões (WHO, 2010; ZINGALES et al., 2014; DIAS et al., 2016).

O desenvolvimento de uma nova substância bioativa com atividade terapêutica de interesse deve obedecer a diversas estratégias a fim de garantir tanto a eficácia do novo tratamento quanto a sua segurança. Para tal, existem estudos e orientações da comunidade científica para o desenvolvimento de novas substâncias com atividade tripanocida, que satisfaçam diversas variáveis a fim de maximizar essa atividade, além de normas e diretrizes obrigatórias estabelecidas por agências regulatórias nacionais e internacionais para avaliar os riscos e garantir a segurança da substância, antes de disponibilizá-las no mercado (OECD, 1997, 2009, 2016; ICH; 1997, 2011; ZINGALES et al., 2014; ANVISA, 2013).

O grupo da Dra. Nubia Boechat sintetiza novas substâncias aplicando métodos de desenvolvimento racional, através de estratégias que direcionem novos compostos a uma ação farmacológica de interesse, ao mesmo tempo em que busca subtrair possíveis reações previsíveis, imprevisíveis ou idiossincráticas, a fim de diminuir o longo tempo inerente a esse tipo de trabalho, e tem obtido sucesso (BOECHAT et al., 2001; CARVALHO et al., 2004; CARVALHO et al., 2006; CARVALHO et al., 2007a). As amostras analisadas nesse estudo são fruto da aplicação dessas estratégias racionais, da aplicação do conhecimento prévio existente sobre as estruturas químicas e seus mecanismos de ação, e adquirido e comprovado a partir de análises de eficácia e segurança (MELLO et al., 2013; BOECHAT et al., 2015; QUARESMA, 2015).

Na síntese de novas moléculas para a doença de Chagas, a atividade tripanocida é a primeira análise a ser realizada para triagem de um conjunto de substâncias recém-

sintetizadas. Nossas amostras (derivados nitro-heterocíclicos), como descrito anteriormente (quadro 1), apresentam atividade tripanocida próximo (PNING 43-14), igual (PNING 39-14) ou melhor (PNING 47-13) quando comparada a atividade do tratamento atual disponível, benzonidazol ($IC_{50} \approx 12 \mu M$), no tratamento *in vitro* de tripomastigotas, cepa Y (DE ARAÚJO et al., 2014; QUARESMA, 2015; MEIRA et al., 2016).

No entanto, após a triagem, é interessante aprofundar as investigações na análise da atividade tripanocida nas demais fases evolutivas do *Trypanosoma cruzi*, principalmente na forma amastigota, para que a atividade de interesse seja a mais próxima possível do cenário infeccioso real, além de determinar o espectro de ação da nova substância, que pode ser variado devido a alta complexidade biológica do protozoário e de sua infecção (GONÇALVES et al., 2011; PONCE et al., 2016). Ou seja, o tratamento de diferentes formas evolutivas pode indicar valores de atividade tripanocida discrepantes, e por isso é interessante aplicar métodos mais reprodutíveis para obtenção de resultados mais confiáveis (NEAL; VAN BUEREN, 1988; SANTORO, et al., 2007; ZINGALES et al., 2014).

No tratamento *in vitro* de amastigotas axênicas (Figuras 14, 26 e 38), determinado pelo ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, todos os derivados nitro-heterocíclicos apresentaram atividade tripanocida. Dentre eles, o PNING 47-13 e o PNING 39-14 apresentaram a melhor atividade tripanocida, como esperado devido aos seus baixos valores de IC_{50} (5,4 e 12,9 μM , respectivamente), a partir de concentrações pequenas (2,5 a 100 $\mu g/mL$), com redução máxima de 90% das células de *T. cruzi*. Além disso, na análise da atividade tripanocida em células de macrófago peritoneal infectadas (Figuras 15, 27 e 39), todos os compostos apresentaram atividade tripanocida, ou seja, a capacidade de diminuir a infecção. No entanto, nesta análise, o derivado nitro-heterocíclico PNING 39-14 parece ter tido a melhor atividade, pois foi capaz de reduzir um maior número de macrófagos infectados e um maior número da população de amastigotas, a partir da menor concentração utilizada (5 $\mu g/mL$).

Esses resultados são importantes por demonstrarem que os compostos analisados apresentam atividade tripanocida em duas formas evolutivas importantes do *T. cruzi*, além de constatarmos que essa atividade de interesse se mantém proeminente nas células do hospedeiro infectadas, nessas condições, sugerindo que os derivados nitro-heterocíclicos atravessam a membrana plasmática do modelo celular utilizados, impedindo a proliferação do *T. cruzi* e a infecção de novas células.

As manipulações na estrutura química dos novos nitro-heterocíclicos na síntese também foram realizadas para observar a hidrofiliabilidade/lipofiliabilidade das novas substâncias, que influenciam na biodisponibilidade nos organismos e na interação com a membrana plasmática das células. O derivado PNING 47-13 apresenta um radical que aumenta a sua hidrofiliabilidade, que pode ter sido uma alteração importante para aumentar a biodisponibilidade dessa substância no meio e a permeabilidade nas células, um problema presente na farmacocinética do benzonidazol e de outros candidatos nitro-heterocíclicos promissores (LEPESHEVA, 2013; PERIN et al, 2017), justificando sua melhor atividade tripanocida quando comparado aos demais derivados estudados (QUARESMA, 2015).

Concomitante às análises iniciais onde investigamos a atividade tripanocida dos derivados nitro-heterocíclicos, foram realizadas as análises preliminares obrigatórias (ANVISA, 2013; OECD, 2015) de citotoxicidade, que buscam identificar os possíveis danos basais e genéricos causados às células por substâncias (xenobióticos) que possam comprometer sua fisiologia normal, levando-as à morte (ESCHER et al, 2002; VINKEN, BLAUBOR, 2017). Dessa forma, determinar os valores que garantam a boa viabilidade das células do hospedeiro e que ainda preservem a atividade de interesse; e caso existam concentrações citotóxicas, investigar os mecanismos de ação que podem estar envolvidos nessa atividade para podermos correlacioná-las às mudanças estruturais químicas realizadas na síntese, gerando novo conhecimento para novas sínteses de substâncias mais seguras.

Na análise da viabilidade celular através do metabolismo mitocondrial pelo teste colorimétrico WST-1 e na análise da integridade da membrana plasmática pelo teste colorimétrico LDH, os derivados nitro-heterocíclicos induziram a queda da viabilidade celular em ambos os ensaios, no tratamento de pelo menos uma linhagem celular, concentração e tempo de exposição, a depender da amostra, demonstrando que os nitro-heterocíclicos são capazes de interferir na homeostase celular pelas vias analisadas.

Tanto o derivado nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figuras 16-19) quanto o PNING 47-13 (Figuras 28-31), nos dois testes, diminuíram a viabilidade celular apenas no tratamento da linhagem celular de hepatocarcinoma humano HepG2. Na análise do metabolismo mitocondrial (WST-1), a menor concentração positiva no tratamento com o derivado PNING 43-14 foi de 25 µg/mL, e no tratamento com o derivado PNING 47-14 foi de 50 µg/mL, ambos apenas depois de 48 h de exposição. Na análise da integridade da membrana plasmática (LDH), a menor concentração positiva no tratamento com o derivado PNING 43-14 foi de 100 µg/mL depois de 24 e 48 h de exposição, e no tratamento com o derivado

PNING 47-13 foi de 25 µg/mL depois de 48 h de exposição. Esses resultados sugerem que nestas condições, a possível metabolização dos compostos seja necessária para a alteração da viabilidade celular e que tenha sido preciso um tempo maior de exposição para que esses efeitos sejam gerados. Mas também um longo período de incubação das células aderentes pode torná-las mais susceptíveis a danos genéricos pela queda do metabolismo das células que pode ocorrer pela mudança de pH do meio e/ou pela depleção de nutrientes essenciais no meio (RISS, et al., 2013).

Ademais, o nitro-heterocíclico PNING 39-14 (Figuras 40-43), no teste colorimétrico WST-1, induziu dano a partir do menor tempo de exposição (3 h), da menor concentração (5,0 µg/mL), no tratamento da cultura de macrófagos RAW 264,7, e a partir da concentração de 50 µg/mL, no maior tempo de exposição (48 h), no tratamento da cultura de hepatocarcinoma humano HepG2; enquanto que no teste colorimétrico LDH, induziu dano a partir da concentração de 25 µg/mL, depois de 24 h de exposição, no tratamento da linhagem RAW 264,7, e induziu dano a partir da concentração de 25 µg/mL, depois de 24 h de exposição e a partir da concentração de 10 µg/mL, depois de 48 h de exposição, no tratamento da linhagem HepG2. Desta forma, conclui-se que o nitro-heterocíclico PNING 39-14 demonstrou ter a maior e irrestrita atividade citotóxica quando comparado aos demais derivados.

Quando analisamos a ocorrência dos eventos, apoptose ou necrose, aos quais os danos genéricos, e danos no DNA e outras macromoléculas podem induzir, através da citometria de fluxo, em macrófagos RAW 264,7, pela ligação da anexina V (apoptose) e/ou do iodeto de propídio (necrose), observamos que somente o nitro-heterocíclico PNING 47-13 (Figura 32) não induziu apoptose e necrose, demonstrando ser o derivado mais seguro, nestas condições.

No entanto, o nitro-heterocíclico PNING 43-14 (Figura 20), após 3 h de tratamento, induziu necrose (100 µg/mL) às células, além de ter sido possível verificar células em estágios finais (tardio) de apoptose (10 a 100 µg/mL). Também, após 24 h de tratamento, a necrose foi o mecanismo de morte celular induzida, evidenciando que o maior tempo de exposição a esse derivado, modifica o mecanismo quando comparado ao menor tempo de exposição. Além dele, o nitro-heterocíclico PNING 39-14 (Figura 44), com a maior atividade citotóxica determinada pelos ensaios de viabilidade celular e atividade citotóxica (WST-1 e LDH), induziu apoptose nos macrófagos, após 24 h de tratamento, o que é interessante, já que esse mecanismo de morte celular é organizado e impede a geração de reações inflamatórias, e a fixação de mutações e outros danos genotóxicos como o micronúcleo, por exemplo

(CUMMINGS; WILLS; SCHNELLMANN, 2004; LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013).

Acredita-se que compostos nitro-heterocíclicos sejam capazes de induzir danos somente após a metabolização (redução) do grupamento nitro (ENANGA et al., 2003; WALSH; MIWA, 2011), como parece ter ocorrido no tratamento das células (HepG2) com os derivados PNING 43-14 e PNING 47-13 nos ensaios colorimétricos. No entanto, como visto no tratamento de macrófagos com o derivado PNING 39-14, a atividade citotóxica pode ocorrer também graças a interação dessas substâncias com sensíveis vias metabólicas e complexos proteicos que garantem a homeostase da célula, principalmente aqueles relacionados aos processos metabólicos mitocondriais, altamente suscetíveis a ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que interfiram no balanço redox mitocondrial e da célula em geral (SQUELLA; BOLLO; NUÑEZ-VERGARA, 2005), e que podem interferir (inibição) nos complexos I e II da cadeia respiratória, principalmente por substâncias que tenham uma cauda lipofílica e uma cadeia cíclica (SCATENA et al., 2007), como o PNING 39-14. Esses resultados sugerem a importância da estrutura química de substâncias, principalmente quanto a lipofilicidade dessas moléculas, que podem desempenhar um papel importante na atividade citotóxica nas células (SCATENA et al., 2007).

Até o momento, o derivado nitro-heterocíclico PNING 47-13, apesar de induzir resultados positivos (citotóxicos) nos testes em concentrações maiores, parece ser a substância mais promissora e segura. No entanto, mesmo quando existam concentrações de qualquer substância que não apresentem atividade citotóxica nos ensaios preliminares, ainda existe a possibilidade dos compostos estarem exercendo outras atividades biológicas (genotóxicas) que podem resultar em doenças que ocorram após muitos anos depois da primeira exposição ou da exposição contínua às substâncias (EISENBRAND et al., 2002; GAD, 2002). Por isso, as análises de genotoxicidade são necessárias (OECD, 1997, 2015, 2016; ICH, 2011; ANVISA, 2013).

Os ensaios de genotoxicidade em bactéria que determinam se um composto é capaz de induzir mutações pontuais no DNA são as primeiras análises recomendadas utilizadas nos estudos toxicológicos (OECD, 1997; 2015; ANVISA, 2013). Em uma abordagem inicial, utilizamos o conjunto recomendado de linhagens da bactéria *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, no teste *Salmonella*/microsoma, capazes de detectar a atividade mutagênica de uma grande variedade de substâncias químicas, incluindo os nitro-heterocíclicos (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; MELLO et al., 2013). Dessa

forma, verificamos se os derivados nitro-heterocíclicos são capazes de induzir mutações pontuais de substituição, adição e/ou deleção de pares de bases.

O derivado PNING 43-14 (Figura 21) induziu mutações no tratamento das linhagem TA97, a partir de 500 µg/mL, e no tratamento das linhagens 100 e TA102, apenas na maior concentração (1000 µg/mL), na ausência de metabolização exógena (S9 mix), e somente no tratamento da linhagem TA100, a partir de 500 µg/mL, na presença de S9 mix. Ou seja, a substância foi capaz de induzir mutações do tipo de deleção (TA97) e de substituição (TA100 e TA102) de pares de bases, supostamente pela ação direta do derivado nitro-heterocíclico. Mas quando o sistema exógeno de metabolização (enzimas do citocromo P450 CYP1A1 e CYP1A2) de substâncias foi adicionado à metodologia, as mutações que foram detectadas no tratamento das linhagens TA97 e TA102 desapareceram, nessas condições. Desta forma, sugere-se que o derivado PNING 43-14 foi metabolizado por enzimas CYP em intermediários ou produtos finais mutagênicos de ação mais específica no tratamento da *S. enterica*. Isso porque a atividade mutagênica do derivado ainda foi detectada no tratamento da linhagem TA100 (somente substituição de pares de base G-C), sugerindo que as mutações por substituição de pares de bases detectada anteriormente no tratamento da TA102, tenham sido uma das outras cinco possibilidades ou que tenham sido resultantes de danos por estresse oxidativo (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Nenhuma atividade citotóxica foi detectada, nessas condições.

O derivado PNING 47-13 (Figura 33), por sua vez, na ausência de S9 mix, na maior concentração utilizada (1000 µg/mL), induziu mutações do tipo substituição de pares de bases G-C (TA100). No entanto, quando adicionamos o sistema metabólico exógeno, a atividade mutagênica ainda permanece, mas o mecanismo de ação é outro: pela deleção de pares de base (TA97), provavelmente pela ação metabólica do S9 mix, em quase todas as concentrações utilizadas, sugerindo também que intermediários ou produtos finais formados são mutágenos mais potentes em relação a atividade direta deste derivado. Além disso, a atividade citotóxica foi detectada apenas na maior concentração utilizada no tratamento das linhagens TA97 e TA100, na ausência de S9 mix.

Por último, o derivado PNING 39-14 (Figura 45) também foi capaz de induzir mutações de deleção (TA97) e substituição de pares de base G-C (TA100), nas duas maiores concentrações, na ausência de S9 mix. Essa atividade mutagênica permaneceu mesmo na presença de S9 mix, sugerindo que talvez esse composto não seja alvo das enzimas de

metabolização exógena, ou caso seja, não altere o mecanismo da ação mutagênica. Nenhuma atividade citotóxica foi detectada, nessas condições.

As análises utilizando as linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102 demonstraram que todos os derivados nitro-heterocíclicos foram capazes de induzir dano ao DNA através de mutações pontuais por pelo menos um mecanismo de ação possível, seja ele pela substituição e/ou pela deleção de pares de base. Essa atividade também foi modulada pela metabolização dos compostos por enzimas do citocromo P450 (S9 mix). No entanto, é importante pontuar que na maioria dos cenários analisados, uma alta concentração de amostra precisou ser utilizada para que a atividade pudesse ser observada. Ou seja, existe uma margem de segurança considerável, nessas condições, que ainda apresentam atividade tripanocida. Além disso, os derivados nitro-heterocíclicos não induziram dano por adição de pares de base G-C (TA98).

Claxton et al. (1991a, 1991b) realizaram uma calibração do teste *Salmonella*/microsossoma utilizando diversos controles positivos (substâncias sabidamente mutagênicas/carcinogênicas) com o objetivo de qualificar a atividade mutagênica das substâncias. Ou seja, definir se uma determinada amostra tem um poder mutagênico em uma escala de classificação entre extremamente alto até questionável e assim, viabilizar a comparação entre as atividades mutagênicas de diversas substâncias. Utilizando esse método (Tabela 2), comparamos a potência mutagênica dos derivados em relação a eles mesmos e as substâncias de origem. Desta forma, observou-se uma diminuição na potência mutagênica dos derivados nitro-heterocíclicos em relação ao Megazol e ao PTAL 04-09 (substâncias de origem na síntese), onde a mutagenicidade foi considerada de extremamente baixa ou questionável, a depender da amostra e da presença de metabolização exógena, comprovando o sucesso da síntese desses derivados, com o objetivo de diminuir a atividade mutagênica.

O potencial mutagênico do tratamento nas demais linhagens utilizadas também apresentaram diminuição em seus valores quando comparado às substâncias de origem (dados não apresentados), na mesma proporção observada na tabela 2. No entanto, a classificação não foi padronizada pelo autor da metodologia e por isso não é possível qualificar os dados na escala proposta para TA100.

Tabela 2: Valores (revertente/ μg) de inclinação da curva (potência mutagênica) utilizando o modelo estatístico de Bernstein, do megazol e seus derivados no tratamento da linhagem de *Salmonella enterica* TA100.

Derivados	Megazol		PTAL 04-09		PNING 43-14		PNING 47-13		PNING 39-14	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
TA100	2195	2364	6,55	3,55	0,354	0,336	0,242	0,027	0,295	0,026

Legenda: Classificação dos valores do poder mutagênico: < 0,1: questionável; 0,1 a 1,0: extremamente baixo; 1,0 a 10: baixo; 10 a 100: moderado; 100 a 1000: alto; > 1000: extremamente alto (CLAXTON et al., 1991a, 1991b; MELLO et al., 2013).

Devido à natureza da estrutura química dos derivados, acredita-se que a metabolização desses compostos ocorra pela redução por um ou dois elétrons (Figura 6), em meio aeróbico ou anaeróbico, possivelmente catalisadas por enzimas nitroreduases e acetiltransferases, entre outras enzimas a depender do modelo biológico (citocromo P450, em mamíferos), produzindo intermediários eletrofílicos reativos, e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio altamente tóxicos, que gerem diversos danos ao DNA e à outras macromoléculas, podendo levar as células à morte (MASON; JOSEPHY, 1985; HEIN, 1988; EDWARDS, 1993; PATTERSON; WYLLIE, 2014).

Para avaliar essa possibilidade, utilizamos linhagens, YG1021 e YG1024, que têm a expressão elevada de enzimas nitroreduases e acetiltransferases, respectivamente, permitindo verificar a influência delas na atividade mutagênica dos derivados nitro-heterocíclicos. Além disso, devido à baixa expressão, mas não ausente, dessas enzimas nas linhagens inicialmente recomendadas (TA97-102), em decorrência da deleção de genes, é recomendada a utilização de linhagens de metabolismo específico em análises específicas, como a nossa (MARON; AMES, 1983; WATANABE; ISHIDATE; NOHMI, 1989, 1990; PORWOLLIK et al., 2001).

De acordo com os resultados obtidos (Figuras 22, 34 e 46), em uma interpretação inicial, nenhum derivado nitro-heterocíclico induziu mutações dependentes de metabolismo por enzimas nitroreduases e acetiltransferases, com ou sem metabolização exógena, no tratamento das linhagens YG1021 e YG1024, que detectam mutações por adição de par de bases. No entanto, observou-se atividade citotóxica de todos os derivados, em pelo menos uma concentração e uma linhagem, tanto na presença quanto na ausência de S9 mix. Essa atividade ocorre concomitante a um inicial e discreto aumento do índice de mutagenicidade dos tratamentos, em concentrações menores, mas que diminui ou desaparece em seguida, nas

maiores concentrações, sugerindo que a atividade citotóxica tenha origem no acúmulo de mutações e/ou outros danos genéricos, levando as células à morte, e impedindo a formação de colônias originadas da reversão do fenótipo *his⁻* das bactérias que sofreram mutações. Ou seja, é possível que os eletrófilos reativos e/ou espécies reativas geradas desse metabolismo não induzam mutações pelo mecanismo de ação ao qual essas linhagens são capazes de evidenciar, e assim formar colônias, pois elas são derivadas da linhagem TA98, que não indicou, nos ensaios anteriores (Figuras 16, 28 e 40), a atividade mutagênica. Desta forma, a ação mutagênica e citotóxica pode estar ocorrendo e acumulando em outros sítios do DNA bacteriano e outras macromoléculas, justificando a atividade citotóxica observada.

Apesar de existir uma correlação de aproximadamente 80% entre uma substância apresentar atividade mutagênica no teste *Salmonella*/microssoma, e ser também carcinogênica em mamíferos (MOHN, 1981; PURCHASE, 1982), é necessária ainda a realização de ensaios utilizando modelos biológicos (células de mamíferos) que possam fornecer resultados mais próximos da realidade para confirmação daqueles obtidos até o momento pelos modelos bacterianos, além de agregar mais informações quanto aos demais danos genéticos que podem ser induzidos pelos derivados (OECD, 1997, 2015, 2016). O teste *in vitro* do micronúcleo identifica substâncias que induzem quebras nos cromossomos e/ou cromátides inteiras, gerando fragmentos, ou devido a alguma deficiência na segregação cromossômica durante a anáfase da divisão celular. Além disso, o micronúcleo é um dano transmitido às células filhas, ou seja, só é possível observá-lo após a célula realizar, pelo menos, uma divisão celular (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013; OECD, 2016).

O derivado nitro-heterocíclico PNING 43-14 induziu a formação de células micronucleadas tanto no tratamento da cultura de macrófagos (Figura 23) quanto de hepatocarcinoma humano (Figura 24). No entanto, o dano em macrófagos RAW 264,7 só foi observado nas maiores concentrações utilizadas, enquanto houve aumento na formação de células micronucleadas no tratamento da HepG2 desde a primeira concentração utilizada (50 µg/mL) e primeiro tempo de exposição (3 h). Algo parecido ocorre na análise da atividade genotóxica do derivado nitro-heterocíclico PNING 47-13, que foi capaz de induzir a formação de micronúcleos nas duas linhagens celulares, porém apenas na maior concentração utilizada (1000 µg/µL), no tratamento de macrófagos RAW 264,7 (Figura 35), enquanto o dano ocorre em concentrações menores (a partir de 100 µg/mL), no maior tempo de exposição (24 h), no tratamento da HepG2 (Figura 36). Pode-se sugerir que há maior susceptibilidade de células metabolicamente competentes ao tratamento, como visto nos ensaios colorimétricos de

viabilidade celular e atividade citotóxica. Além disso, o derivado PNING 39-14 (Figuras 47 e 48), induziu a formação de células micronucleadas nas duas linhagens celulares utilizadas, sem distinções evidentes entre elas, ratificando ser a substância que tem atividade tóxica mais proeminente.

Muitos compostos azois (nitroimidazóis e nitrotriazóis) estão disponíveis no mercado e são recomendados no tratamento de diversas doenças infecciosas, como no tratamento da infecção por fungos, e também apresentam outras atividades de interesse como a atividade tripanocida. O mecanismo de ação dessas substâncias nesses organismos é similar, inclusive em mamíferos, e ocorre pela inibição de enzimas envolvidas na biossíntese de esteroides, como o colesterol, importante para a síntese de diversos hormônios. Os genes do citocromo P450 (CYP51 e CYP19), são responsáveis pela síntese dessas enzimas. Acredita-se que essa atividade enzimática inibitória esteja relacionada a grande afinidade de ligação dessas substâncias ao átomo de ferro do grupo heme, presente em toda enzima do citocromo P450, o que pode justificar a inibição enzimática de inúmeras enzimas de genes do citocromo P450 responsáveis pela metabolização de xenobióticos (ZHANG, et al., 2002; NIWA; SHIRAGA; TAKAGI, 2005; LEPESHEVA et al., 2007; LIN; CHOU; CHEN, 2014; KEENAN; CHAPLIN, 2015). Outro fator importante que aumenta a interação de um determinado substrato a enzimas do CYP450 é a lipofilicidade da molécula (SMITH et al., 1998).

No entanto, também existem diversos relatos de que compostos nitro-heterocíclicos podem induzir a expressão de diversos genes do CYP450. Acredita-se que a expressão desses genes e a subsequente metabolização de compostos contendo grupamentos com nitrogênio por essas enzimas, esteja intimamente ligada à sua atividade genotóxica e, em mamíferos, essas reações podem ser moduladas por enzimas do citocromo P450 gerando eletrófilos e radicais livres (WALSH; MIWA, 2011).

Em decorrência desses fenômenos, e a depender das concentrações administradas, os derivados nitro-heterocíclicos podem acumular no plasma dos organismos, a depender do poder inibitório de enzimas, gerando efeitos adversos, ou serem biotransformadas em intermediários genotóxicos, a depender da capacidade de indução da expressão de determinados genes do citocromo P450 (OGU; MAXA, 2000; LYNCH; PRICE, 2007).

É relatado que o gene do citocromo P450 CYP3A4 tem maior participação na metabolização de xenobióticos (GUENGERICH; 2006, 2008). Nas nossas análises, observamos que a expressão deste gene (CYP3A4) foi induzida pelos tratamentos com os derivados PNING 43-14 (Figura 25) e PNING 47-13 (Figura 37) das células de hepatocarcinoma humano HepG2. Dessa forma, acredita-se que essas enzimas sejam

responsáveis pela metabolização desses derivados, pois um gene CYP450 induzido, é responsável pela metabolização do seu indutor. No entanto, observou-se também que a expressão dos demais genes (CYP1A2, CYP2E1 e CYP2B6) foi inibida. Esse fenômeno não é incomum, pois um mesmo indutor de determinado gene, pode estar inibindo a expressão de outros genes ou a atividade enzimática deles (ZHU, 2010).

Ademais, esses conceitos não são absolutos e uma interpretação definitiva não deve ser feita baseado apenas na avaliação da expressão gênica, pois uma regulação pós-transcricional e em uma atividade pós-traducional pode ocorrer, principalmente por esse tipo de agrupamento de substâncias. Isto porque é relatado que o benzonidazol, entre outros derivados nitro-imidazois, apesar de induzir a expressão de CYP3A4 no tratamento de células HepG2, inibe a atividade da enzima CYP3A4 sintetizada, demonstrando que a indução da expressão de determinado gene por uma substância não esteja necessariamente relacionada a sua atividade enzimática normal (MAURICE et al., 1992; RIGALLI et al., 2012).

Apesar do gene do citocromo P450 CYP3A4 ter maior participação no metabolismo de substâncias, é interessante avaliar a expressão dos demais genes CYP450, principalmente daqueles que possam estar mais relacionados ao metabolismo de pró-carcinógenos e na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, fenômenos relacionados a expressão da família CYP1A, inclusive por fármacos nitro-heterocíclicos antiparasitários (BAPIRO, et al., 2002); que também sejam mais suscetíveis a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, relacionados à subfamília CYP2E1 (HRYCAY; BANDIERA, 2015); ou que, apesar de terem pequena participação no metabolismo geral de xenobióticos em relação aos demais genes, tenham participação importante na gênese de intermediários eletrofílicos, relacionados a expressão da subfamília CYP2B6 (ZANGER; SCHWAB, 2013). Neste cenário, o PNING 39-14 (Figura 49) foi capaz de induzir a expressão dos genes CYP1A2, CYP2B6 e do CYP2E1, indicando que esse derivado pode ser suscetível a geração de efeitos indesejados mais proeminentes quando comparado aos outros derivados. Bapiro et al. (2002) relataram uma atividade parecida ao avaliar a expressão de CYP1A e o dano por estresse oxidativo no tratamento de cultura de HepG2 com o carbamato de benzimidazol (albendazol), um nitro-heterocíclico aromático imidazol já comercializado. Outros compostos dessa natureza também são capazes de induzir a subfamília CYP1A2 (MAURICE et al., 1992).

Como podemos observar, através de nossos resultados e de relatos da comunidade científica, diferentes substâncias contendo um agrupamento nitro-heterocíclico podem induzir ou inibir a expressão de diferentes genes do citocromo P450, sugerindo que a dinâmica desses mecanismos é muito complexa. No entanto, é consenso que o sistema de metabolização por

esses genes é responsável, em eucariotos, pelos efeitos adversos e genotóxicos gerados, o que justifica o monitoramento dos genes expressos a fim de selecionar o candidato que tenha menor interação com esses sistemas de metabolização. Além disso, outras enzimas como as redutases, sulfotransferases, glutatona, podem estar envolvidas na biotransformação dos nossos derivados nitro-heterocíclicos e de outros nitrocompostos (WANG; GUENGERICH, 2013).

Os derivados nitro-heterocíclicos promoveram danos genéricos (citotóxicos) e genotóxicos em quase toda análise realizada. Os resultados das análises de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade sugerem que a metabolização dessas substâncias parece ser importante para a atividade tóxica positiva na maioria dos tratamentos, e que a ação direta dos derivados também é relevante, provavelmente pela inibição de enzimas, de processos metabólicos normais e pela indução de danos genéricos, e não pode ser ignorada. Esse comportamento já era esperado, pois essa atividade tóxica, entre outros tipos de danos induzidos, é relatada em diversos estudos (MORAIS et al., 1998; POLI et al., 2002; NESSLANY et al., 2004; MITAL, 2009; MELLO et al., 2013; BOECHAT et al., 2015) e o mecanismo de ação é sugerido (MASON; JOSEPHY, 1985; HEIN, 1988; EDWARDS, 1993; WALSH; MIWA, 2011; PATTERSON; WYLLIE, 2014).

Ademais, apesar dos três derivados nitro-heterocíclicos analisados neste estudo compartilharem grandes similaridades, anel 4-imidazol e anel 1,2,3-triazol, em sua estrutura química, os radicais presentes em cada molécula podem ter sido diferenças químicas estruturais suficientes para induzirem respostas, mesmo que positivas, discrepantes nas análises toxicológicas e de atividade tripanocida. Outro estudo realizado por nosso grupo (BOECHAT et al., 2015) também observou que mesmo um grande grupo de moléculas contendo o mesmo anel nitro-imidazol, mas com diferentes radicais acoplados a ele, em diferentes posições (carbono) no anel, as atividades genotóxicas foram variadas, incluindo exemplares que não apresentaram essa atividade, sugerindo que nem sempre o grupamento nitro é responsável por esse efeito. No entanto, a atividade terapêutica de interesse também sofre mudanças. Isso confirma que pequenas alterações na estrutura química promovem atividades altamente moduláveis que permitem manipular a síntese de novas substâncias de acordo com nosso interesse.

Os nitrocompostos geralmente são estigmatizados, e um certo preconceito no desenvolvimento e aplicação desses compostos pode existir devido a esse heterogêneo comportamento biológico (PATTERSON; WYLLIE, 2014). No entanto, nitrocompostos são substâncias com amplo espectro de ação e diversos medicamentos já estão no mercado para o

tratamento de diversas doenças parasitárias. Entre eles, fungicidas, bactericidas e anti-protozoários são recomendados. Além disso, uma grande quantidade de substâncias contendo algum grupamento nitro é investigada quanto aos mais diversos alvos terapêuticos, justificativa suficiente para que novas substâncias sejam sintetizadas, buscando reduzir os efeitos tóxicos, como demonstrado neste trabalho e em outros (MELLO et al., 2013; BOECHAT et al., 2015).

CONCLUSÕES

- Os derivados nitro-heterocíclicos apresentaram atividade tripanocida em cultura de células de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, na forma evolutiva amastigota axênica;
- Os derivados nitro-heterocíclicos apresentaram atividade tripanocida em cultura de células primárias de macrófagos de camundongo *Swiss Webster* infectados com células de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, na forma evolutiva amastigota;
- Os derivados nitro-heterocíclicos apresentaram atividade citotóxica nos testes colorimétricos WST-1 e LDH. Os derivados PNING 43-14 e PNING 47-13 induziram danos apenas no tratamento em cultura de células de hepatocarcinoma humano HepG2, enquanto o derivado PNING 39-14 no tratamento de cultura de HepG2 e de macrófagos de RAW 264,7, em pequenas concentrações e menor tempo de exposição (3 h);
- O derivado nitro-heterocíclico PNING 43-14 induziu danos a cultura de macrófagos RAW 264,7 levando-as à morte por necrose, enquanto o derivado PNING 39-13 por apoptose. O derivado PNING 47-13 não induziu morte nas condições estudadas;
- Os derivados nitro-heterocíclicos induziram mutações pontuais de substituição e deleção de pares de bases no tratamento das linhagens de *Salmonella enterica* TA97, TA98, TA100 e TA102, na ausência e na presença de metabolização exógena;
- Os derivados nitro-heterocíclicos induziram resposta citotóxica no tratamento das linhagens de *Salmonella enterica* YG1021 e YG1024 que super-expressam enzimas nitroredutases e acetiltransferases, comprovando o envolvimento dessas enzimas na metabolização dos derivados nitro-heterocíclicos gerando produtos citotóxicos;
- Os derivados nitro-heterocíclicos induziram a formação de células micronucleadas no tratamento de cultura de células hepatocarcinoma humano HepG2 e macrófagos RAW 264,7;
- Os derivados nitro-heterocíclicos PNING 43-14 e PNING 47-13 induziram o aumento da expressão do gene do citocromo P450 CYP3A4 e inibiram a expressão dos genes CYP1A2, CYP2B6 e 2E1, enquanto o derivado PNING 39-14 induziu a

expressão dos genes CYP1A2, CYP2B6 e CYP2E1, enquanto inibiu a expressão do gene CYP3A4, no tratamento de cultura de células hepatocarcinoma humano HepG2.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. E. Redox, radiation and reductive bioactivation. *Radiation Research*, v. 132, n. 2, p. 129-139, 1992.
- ADAMS, G. E.; STRATFORD, I. J. *Bioreductive drugs for cancer therapy: the search for tumor specificity*. *International Journal of Radiation Oncology, Therapy, Biology, Physics*, v. 29, n. 2, p. 231-238, 1994.
- ADAMS, G. E.; STRATFORD, I. J. Hypoxia-mediated nitro-heterocyclic drugs in the radio- and chemotherapy of cancer. An overview. *Biochemical Pharmacology*, v. 35, n. 1, p. 71-76, 1986.
- AFDERHEIDER, A. C. et al. A 9.000 years record of Chagas disease. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, v. 101, n. 7, p. 2034-2039, 2004.
- AGALAVE, S. G.; MAUJAN, S. R.; PORE, V. Click chemistry: 1,2,3-triazoles as pharmacophores. *Chemistry, an Asian Journal*, v. 6, n. 10, p. 2396-2718, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2013). Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Guia%2Bde%2BEstudos%2BN%25C3%25A3o%2BC1%25C3%25ADnicos%2B-%2Bvers%25C3%25A3o%2B2.pdf/0afb3f3b-7a32-4232-a7e2-de8ef460c9f7>. Acesso em: jan. 2017.
- AIUB, C. A.; PINTO, L. F.; FELZENSZWALB, I. Standardization of conditions for the metabolic activation of *N*-nitrosodiethylamine in mutagenicity tests. *Genetics and Molecular Research*, v. 3, n. 2, p. 264-272, 2004.
- ALBURQUERQUE, C. N.; PERIE, J. J. Nova rota de síntese do Megazol 1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-il)-5-nitroimidazol, um antiparasitário ativo contra o *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 35, n. 1, p. 59-64, 1999.
- ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug metabolism in the liver. *Clinics in Liver Disease*, v. 21, n. 1, p. 1-20, 2017.
- AL-SOUD, Y. A. et al. Nitroimidazoles. V. Synthesis and anti-HIV evaluation of new 5-substituted piperazinyl-4-nitroimidazole derivatives. *Acta Pharmaceutica*, v. 57, n. 4, p. 379-393, 2007.
- AMES, B. N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, v. 204, n. 4393, p. 587-593, 1979.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.

ANDRADE, Z. et al. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 201-230 p.

ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal of Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n. 2, p. 95-111, 2014.

ANDREWS, N. W. et al. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 64, n. 3, p. 474-484, 1987.

ANGHEBEN, A. et al. *Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries*. *Blood Transfusion*, v. 13, n. 4, p. 540-550, 2015.

ANTUNES, A. P. et al. Benznidazole therapy for Chagas disease In asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors: evaluation of the efficacy of different treatment regimens. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 6, p. 713-720, 2016.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Deisng, Development and Therapy*, v. 4, p. 243-253, 2010.

ARMAGANIJAN, L.; MORILLO, C. A. *Chagas disease: 101 years of solitude: time for action*. *Stroke: Journal of the American Heart Association*, v. 41, n. 11, p. 2453-2454, 2010.

ATTERWILL, C. K.; WING, M. G. *In vitro* preclinical lead optimization technologies (PLOTs) in pharmaceutical development. *Toxicology Letters*, v. 127, n. 1-3, p. 143-151, 2002.

BAPIRO, T. E. et al. *Cytochrome P450 1A1/2 induction by antiparasitic drugs: dose-dependent increase in ethoxyresorufin O-deethylase activity and mRNA caused by quinine, primaquine and albendazole in HepG2 cells*. *Pharmacokinetics and Disposition*, v. 58, p. 537-542, 2002.

BARR, S. C. et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 12, p. 5160-5161, 2005.

BENAIM, G. et al. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 3, p. 892-899, 2006.

BERGMEYER, H. U. *Methods of enzymatic analysis: Lactate dehydrogenase*. New York: Academic Press, 1974.

BERKELHAMMER, G.; ASATO, G. *2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole: a new antimicrobial agent*. *Science*, v. 162, n. 3858, p. 1146, 1968.

BERMUDEZ, J. et al., Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, v. 156, p. 1-16, 2016.

BERN, C. et al. *Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review*. JAMA: The Journal of the American Medical Association, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, 2007.

BEYER, C. et al. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 370, n. 9587, p. 619-627, 2007

BOECHAT, N. et al. Novel nitroimidazoles with trypanocidal and cell growth inhibition activities. *Cytobios*, v. 105, n. 409, p. 83-90, 2001.

BOECHAT, N. et al. *Studies of genotoxicity and mutagenicity of nitroimidazoles: demystifying this critical relationship with the nitro group*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 110, n. 4, p. 492-499, 2015.

BOVERIS, A. et al. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical Journal*, v. 188, n. 3, p. 643-648, 1980.

BOUTEILLE, B. et al. Effect of megalol on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in Swiss mice. *Acta Tropica*, v. 60, n. 2, p. 73-80, 1995.

BOUTEILLE, B.; CHAUVIERE, G. Use of megalol for the treatment of trypanosomiasis. *Médecine Tropicale: Revue du Corps de Santé Colonial*, v. 59, n. 4, p. 321-330, 1999.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. *Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying*. *Biochemistry Moscow*, v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.

BRODIE, M. J. et al. *Enzyme induction with antielipetic drugs: cause for concern?* *Epilepsia*, v. 54, n. 1, p. 11-27, 2013.

BUSCHINI, A. et al. Trypanocidal nitroimidazole derivatives: Relationships among chemical structure and genotoxic activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 73, n. 10, p. 1537-1547, 2007.

CAMANDAROBA, E. L. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistance colombian strain. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 2, p. 201-209, 2003.

CARRANZA, J. C. et al. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Internacional Journal for Parasitology*, v. 39, p. 963-973, 2009.

CARRILERO, B. et al. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. *Revista Española de Quimioterapia: Publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, v. 24, n. 3, p. 123-126, 2011.

CARVALHO, G. et al. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion of some genera and species of the tribe Triatomini Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, n. 1, p. 33-37, 1998.

CARVALHO, S. A. et al. Design, synthesis and activity against *Trypanosoma cruzi* of azaheterocyclic analogs of megalol. *Medicinal Chemistry*, v. 3, n. 5, p. 460-465, 2007b.

CARVALHO, S. A. et al. Studies toward the structural optimization of new brazilzone-related trypanocidal 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 1, p. 413-421, 2007a.

CARVALHO, S. A. et al. Synthesis and antitrypanosomal profile of new functionalized 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives, designed as non-mutagenic megalol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, n. 24, p. 5967-5970, 2004.

CARVALHO, S. A. et al. Synthesis and trypanocidal evaluation of news 5-[N-(3-(5-Substituted)-1,3,4-Thiadiazolyl)]Amino-1-Methyl-4-Nitroimidazoles. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 3, n. 2, p. 98-101, 2006.

CELIK, A.; ARAS-ATES, N. The frequency of sister chromatid exchanges in cultured human peripheral blood lymphocyte treated with metronidazole *in vitro*. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 29, n. 1, p. 85-94, 2006.

CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. *Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 2, n. 11, p. 1187-1213, 2002.

CHAGAS, C. *Nova tripanomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi, n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, n. 2, p. 159-228, 1909.

CHAGAS, C. *Processos patogênicos da tripanozomíase americana*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 8, p. 5-36, 1916a.

CHAGAS, C. *Tripanosomíase americana. Forma aguda da moléstia*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 8, p. 37-65, 1916b.

CHAGAS, C; VILLELA, E. *Forma cardíaca da tripanossomíase americana*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 14, p. 5-61, 1922.

CHATELAIM, E. *Chagas disease drug Discovery: toward a new era*. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 20, n. 1, p. 22-35, 2015.

CHAUVIÉRE, G. et al. Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogs to megalol, a trypanocidal lead. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 3, p. 427-440, 2003.

CLAYTON, J. *Chagas disease: pushing through the pipeline*. *Nature*, v. 465, n. 7301, p. S12-S15, 2010.

CLAXTON, L. D. et al. *Assessing the use of known mutagens to calibrate the Salmonella typhimurium mutagenicity assay: II. with exogenous activation*. *Mutation Research*, v. 253. n. 1991, p. 149-159.

CLAXTON, L. D. et al. *Assessing the use of known mutagens to calibrate the Salmonella typhimurium mutagenicity assay: I. without exogenous activation*. *Mutation Research*, v. 253. n. 1991, p. 137-147.

CONTRERAS, V. T. et al. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 16, n. 3, p. 315-327, 1985.

CORASSA, R. B et al. *Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review*. *Perspectives in Public Health*, 2016.

COURA, J. R. et al. Tentativa terapêutica com a nitrofurazona (furacin) na forma crônica da doença de Chagas. *O Hospital*, v. 60, p. 425-429, 1961.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its Discovery. A systematic review. *Acta Tropica*, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.

COURA, J. R.; CASTO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its Discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; FERREIRA, L. F.; SILVA, J. R. Experiências com nitrofurazona na fase crônica da doença de Chagas. *O Hospital*, v. 62, p. 957-964, 1962.

COURA, J. R.; SILVA, J. R. Aspectos atuais do tratamento da doença de Chagas. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 51, p. 283-290, 1961.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, short history and controlo of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 7, p. 856-862, 2014.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – a comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

CUMMINGS, B. S.; WILLS, L. P.; SCHNELLMANN, R. G. Measurement of cell death in mammalian cells. *Current Protocols in Pharmacology*, 2004.

DE ARAUJO, J. S. et al. *In vitro* and *in vivo* studies of the biological activity of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 7, p. 4191-4195, 2014.

DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. L. Effect of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell *in vitro*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82, n. 2, p. 209-218, 1986.

DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. L. Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivate upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 85, n. 1, p. 95-99, 1990.

DIAS, E. Um ensaio de profilaxia da moléstia de Chagas. *Imprensa Nacional, Rio de Janeiro*, p. 116, 1945.

DIAS, J. C. P. Aspectos socioculturais e econômicos na expansão e no controle da doença de Chagas humana. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, v. 65, n. 1, p. 119-126, 1985a.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e a questão da tecnologia. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana*, v. 99, n. 3, 1985b.

DIAS, J. C. P. et al. 2nd brazilian consensus on Chagas disease, 2015. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 1, p. 3-60, 2016.

DIAS, J. C. P.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 2, p. 193-196, 2008.

DOLL, R. Strategy for detection of cancer hazards to man. *Nature*, v. 265, p. 589-596, 1977.

DOYLE, P. S. et al. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in a immunodeficient-mouse model of infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 11, p. 3932-3939, 2007.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery*, v. 2, n. 1, p. 19-51, 2007.

EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 31, n. 1, p. 9-20, 1993.

EISENBRAND, G. et al. Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.

EHLHARDT, W. J.; BEAULIEU, B. B.; GOLDMAN, P. Mammalian cell toxicity and bacterial mutagenicity of nitrosoimidazoles. *Biochemical Pharmacology*, v. 37, n. 13, p. 2603-2606, 1998.

ENANGA, B. et al. Activity of Megazol, a trypanocidal nitroimidazole, is associated with DNA damage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 10, p. 3368-3370, 2003.

ENANGA, B. et al. Megazol combined with suramin: a chemotherapy regimen which reversed the CNS pathology in a model of human african trypanosomiasis in mice. *Tropical Medicine & International Health*, v. 3, n. 9, p. 736-741, 1998.

ENGEL, J. C. et al. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 188, n. 4, p. 725-734, 1998.

ESCHER, B. I. et al. Baseline toxicity (narcosis) of organic chemicals determined by *in vitro* membrane potential measurements in energy-transducing membranes. *Environmental Science and Technology*, v. 36, n. 9, p. 1971-1979, 2002.

ESPERANDIM, V. R. et al. Reduction of parasitism tissue by treatment of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* with lignano lactones. *Parasitology Research*, v. 107, n. 3, p. 525-530, 2010.

FADOK, V. A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology*, v. 148, n. 7, p. 2207-2216, 1992.

FERREIRA, H. O. Fase aguda da doença de Chagas. *O Hospital*, v. 61, p. 307-311, 1962.

FERREIRA, H. O. Forma aguda da doença de Chagas tratada pela nitrofurazona. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 3, n. 6, p. 287-289, 1961.

FERREIRA, H. O. Tratamento da forma inderterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benznidazol. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.23, p. 209-211, 1990.

FERREIRA, H. O.; PRATA, A.; RASSI, A. Administração prolongada de nitrofurazona no tratamento da doença de Chagas aguda. *O Hospital*, v. 63, p. 131-139, 1963.

FERREIRA, M. L. G. et al. Design, synthesis, and antiviral activity of new 1*H*-1,2,3-triazole nucleoside ribavirin analogs. *Medicinal Chemistry Research*, v. 23, n. 3, p. 1501-1511, 2014.

FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. CL 64.855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug, is also mutagenic in the *Salmonella*/microsome assay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 1, p. 49-52, 1986.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. A rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 79, n. 2, p. 221-225, 1984.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. A. A nitroimidazol-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 76, n. 3, p. 293-297, 1982.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 5, p. 755-759, 1987.

FRANÇA, R. R. F. et al. Inibidores potentes da enzima sterol 14 α -desmetilase contra *Trypanosoma cruzi*. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 5, p. 1483-1516, 2014.

FREITAS, L. B. O. et al. A reação "click" na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. *Química nova*, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.

GAD, S. C. *Drug Safety Evaluation*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2002. 1007 p.

GENNARI, A. et al. *Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing: the report and recommendations of ECVAM workshop 50*. *Alternatives to Laboratory Animal*, v. 32, n. 4, p. 437-459, 2004.

GOLLAPUDI, B. B.; KRISHNA, G. *Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective*. Mutation Research, v. 455, n. 1-2, p. 21-28, 2000.

GONÇALVES, R. L. S. et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 43, n. 6, p. 651-661, 2011.

GOODSON, W. H. et al. *Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead*. Carcinogenesis, v. 36, n. 1, p. S254-S296, 2015.

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

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and chemical toxicology. Chemical Research in Toxicology, v. 21, n. 1, p. 70-83, 2008.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. The AAPS Journal, v. 8, n. 1, p. E101-111, 2006.

GUHL, F. et al. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4.000-years-old mummified human tissue from northern Chile. American Journal of Physical Anthropology, v. 108, n. 4, p. 401-407, 1999.

GUNAY, N. S. et al. 5-Nitroimidazole derivatives as possible antibacterial and antifungal agentes. Farmaco, v. 54, n. 11-12, p. 826-831, 1999.

HAFEZ, H. N.; ABBAS, H. A.; EL-GAZZAR, A. R. Synthesis and evaluation of analgesic, anti-inflammatory and ulcerogenic activities of some triazolo- and 2-pyrazolyl-pyrido[2,3-d]-pyrimidines. Acta Pharmaceutica, v. 58, n. 4, p. 359-378, 2008

HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. The Journal of Biological chemistry, v. 286, n. 15, p. 13088-13095, 2011.

HARTH, G. et al. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 58, n. 1, p. 17-24, 1993.

HEIN, D.W. Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. Biochimica et Biophysica Acta, v. 948, n. 1, p. 37-66, 1988.

HIGUERA, S. L.; GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) through the implementation of high-resolution melting (HRM) genotyping assay. Parasites & Vectors, v. 6, p. 112, 2013.

HERNÁNDEZ-OSÓRIO, L. A. et al. *Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of Trypanosoma cruzi: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010.

HORAE, C. A. They trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph, p. 48-51, 1972.

HORAE, C. A.; WALLACE, F. G. *Development stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology*. Nature, v. 222, p. 1385-1386, 1966.

HOUCK, K. A.; KAVLOCK, R. J. *Understanding mechanisms of toxicity: insights from drug discovery research*. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 227, n. 2, p. 163-178, 2007.

HRYCAY, E. G.; BANDIERA, S. M. Involvement of cytochrome P450 in reactive oxygen species formation and cancer. *Advances in Pharmacology*, v. 74, p. 35-84, 2015.

HUGGINS, D. J.; SHERMAN, W.; TIDOR, B. Rational approaches to improving selectivity in drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 1424-1444, 2012.

INTERNACIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION. *ICH harmonized tripartite guideline: guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1) (2011)*. Disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/safety-single/article/guidance-on-genotoxicity-testing-and-data-interpretation-for-pharmaceuticals-intended-for-human-use.html>. Acesso em: jan. 2017.

INTERNACIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION. *ICH harmonized tripartite guideline: preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6 (R1) (1997)*. Disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/safety-single/article/preclinical-safety-evaluation-of-biotechnology-derived-pharmaceuticals.html>. Acesso em: jan. 2017.

IRIGOÍN, F. et al. *Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification*. Free Radical Biology & Medicine, v. 45, n. 6, p. 733-742, 2008.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 95-97, 2007.

JONES, D. P. et al. Mechanisms of pathogenesis in drug hepatotoxicity putting the stress on mitochondria. *Molecular Interventions*, v. 10, n. 2, p. 98-111, 2010.

JOSEPHY, P. D.; LORD, H. L.; SNIECKUS, V. A. *Dimethylnitrosamine genotoxicity: does N-acetyltransferase activity play a role?* Carcinogenesis, v. 15, n. 3, p. 479-482, 1994.

KAPOOR, V. K. et al. *Medicinal significance of nitroimidazoles: some recent advances*. Journal of Scientific & Industrial Research, v. 62, p. 659-665, 2003.

KARNTHALER-BENBAKKA, C. et al. Targeting a targeted drug: an approach toward hypoxia-activatable tyrosine kinase inhibitor prodrugs. *Chemmedchem*, 2016.

KEENAN, M.; CHAPLIN, J. H. *A new era for Chagas disease drug discovery?* Progress in Medicinal Chemistry, v. 54, p. 185-230, 2015.

KLEIN, S. L. Hormonal and immunological mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology*, v. 26, n. 6-7, p. 247-264, 2004.

KLÓSEK, M. et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in prostate cancer cells after treatment with xanthohumol – a natural compound present in *Humulus lupulus* L. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 837, p. 1-17, 2016.

KHARB, R.; SHARMA, P. C.; YAR, M. S. Pharmacological significance of triazole scaffold. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 11, p. 1-21, 2010.

KRAU, S. D. *Cytochrome p450 part 3: drug interactions*. *The Nursing Clinics of North America*, v. 48, n. 4, p. 697-706, 2013.

LEITE, J. P. et al. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabiadea triplinervia* and derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 11, p. 2307-2309, 2006.

LENT, A., WIGODZINSKY, P. Revision of the triatomine (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, New York, art. 3, p. 520, 1979.

LEPESHEVA, G. I. *Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise?* *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 8, n. 12, p. 1479-1489, 2013.

LEPESHEVA, G. I. et al. *Sterol 14 α -demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth*. *Chemistry & Biology*, v. 14, n. 11, p. 1283-1293, 2007.

LEPESHEVA, G. I.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Chapter 4 – targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14 α -demethylase (CYP51). *Advances in Parasitology*, v. 75, p. 65-87, 2011.

LEY, V. et al. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 168, n. 2, p. 649-659, 1988.

LIN, C. H.; CHOU, P. H.; CHEN, P. J. Two azole fungicides (carcinogenic triadimefon and non-carcinogenic myclobutanil) exhibit different hepatic cytochrome P450 activities in medaka fish. *Journal of Hazardous Material*, v. 277, p. 150-158, 2014.

LINDSEY, M. H. et al. The epidemiology, clinical manifestations, and management of Chagas heart disease. *Clinical Cardiology*, v. 38, n. 9, p. 565-569, 2015.

LIU, G.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, v. 44, n. 5, p. 479-496, 2010.

LOUP, G.; PIALOUX, G.; LESCURE, F. X. Update in treatment of Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 24, n. 5, p. 428-434, 2011.

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. *Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond*. *Frontiers in Genetics*, v. 4, n. 131, p. 1-17, 2013.

LYNCH, T.; PRICE, A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American Academy of Family Physicians*, v. 76, n. 3, p. 391-396, 2007.

MAGUIRE, J. H. *Treatment of Chagas' disease – time is running out*. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 4, p. 1369-1370, 2015.

MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p. 319-324, 2009.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MARTINS, T. A. F. et al. Benznidazole/itraconazole combination treatment enhances anti-*Trypanosoma cruzi* activity in experimental Chagas disease. *PLoS One*, v. 10, n. 6, p. 1-12, 2015.

MARTINS-MELO, F. R. et al. *Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis*. *Acta Tropica*, n. 130, p. 167-174, 2014.

MASON, R. P.; JOSEPHY, P. P. *Free radical mechanisms of nitroreductase*. Washington: D. E. Rickert, 1985, 121-140 p.

MAURICE, M. et al. Effects of imidazole derivatives on cytochromes P450 from human hepatocytes in primary culture. *FASEB Journal*, v. 6, n. 2, p. 752-758, 1992.

MAYA, J. D. et al. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. *Biochemical Pharmacology*, v. 65, n. 6, p. 999-1006, 2003.

MCKERROW, J. H.; MCGRATH, M. E.; ENGEL, J. C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. *Parasitology Today*, v. 11, n. 8, p. 279-282, 1995.

MEIRA, C. S. et al. Antiparasitic evaluation of betulinic acid derivatives reveals effective and selective anti-*Trypanosoma cruzi* inhibitors. *Experimental Parasitology*, v. 166, p. 108-115, 2016.

MEIRELLES, M. N. L.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; DE SOUZA, W. *Interaction of Trypanosoma cruzi with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 68, p. 7-14, 1982.

MELLO, F. V. C. et al. Evaluation of genotoxic effects of new molecules with possible trypanocidal activity for Chagas disease treatment. *The Scientific World Journal*, 2013.

MELO, J. O. F. et al. *Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas*. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 569-571, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL (2015). Boletim epidemiológico - Doença de Chagas água no Brasil – série histórico de 2000 a 2013. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>. Acesso em: jan. 2017.

MISHRA, N. et al. Synthesis of novel substituted 1,3-diaryl propenone derivatives and their antimalarial activity *in vitro*. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 43, n. 7, p. 1530-1535, 2008.

MITAL, A. *Synthetic nitroimidazoles*: biological activities and mutagenicity relationships. Scientia Pharmaceutica, v. 77, n. 3, p. 497-520, 2009.

MOHN, G. R. Bacterial systems for carcinogenicity testing. Mutation Research, v. 87, n. 2, p. 191-210, 1981.

MOLINA, I. et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. The New England Journal of Medicine, v. 370, n. 20, p. 1899-1908, 2014.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. The use of posaconazole against Chagas disease. Current Opinion in Infectious Diseases, v. 28, n. 5, p. 397-407, 2015.

MOLINA, J. et al. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 44, n. 1, p. 150-155, 2000.

MOLYNEUX, D. H.; MALECELA, M. N. Neglected tropical diseases and the millennium development goals – why the “other diseases” matter: reality versus rhetoric. Parasite & Vectors, v. 4, p. 234, 2011.

MONTGOMERY, S. P. et al. What do we know about Chagas disease in the United States? American Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 95, n. 6, p. 1225-1227, 2016.

MORAES, C. B. et al. *Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug Discovery and development. Scientific Reports, v. 4, p. 4703, 2014.

MORAIS, M. A. et al. Mutagenic activation of CL64,855, an anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivat, by bacterial nitroreductases. Genetics and Molecular Biology, v. 21, n. 4, 1998.

MORELLO, A. et al. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. Comparative Biochemistry and Physiological. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, v. 107, n. 3, p. 367-371, 1994.

MORILLO, C. A, et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. The New England Journal of Medicine, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, 2015.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation Research, v. 455, n. 1-2, p. 26-60, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *The Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAÇÕES UNIDAS (2015). *Transformando nosso mundo: a agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável*. Disponível em: <http://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>. Acesso em dez. 2016.

NAGARAJAN, K. et al. Nitroimidazoles XXI 2,3-dihydro-6-nitroimidazo [2,1-b] oxazoles with antitubercular activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 6, p. 631-633, 1989.

NEAL, R. A.; VAN BUEREN, J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 5, p. 709-714, 1988.

NESSLANY, F. et al. In vitro and in vivo chromosomal aberrations induced by Megazol. *Mutation Research*, v. 560, n. 2, p. 147-158, 2004.

NIWA, T.; SHIRAGA, T.; TAKAGI, A. Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 9, p. 1805-1808, 2005.

NUNO, V. *Biomedical chemistry: current trends and developments*. Berlin: Gruyter Open, 2015. 50 p.

NWAKA, S. HUDSON, A. Innovative lead Discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews*, v. 5, n. 11, p. 941-955, 2006.

OGU, C. C.; MAXA, J. L. Drug interactions due to cytochrome P450. *Pharmacology Notes*, v. 13, p. 421-423, 2000.

OLIVIERI, B. P. et al. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine modelo of Chagas disease. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 36, p. 79-83. 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (1997). *OECD guideline for testing of chemicals: bacterial reverse mutation test*. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071247-en>. Acesso em: jan. 2017.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (2009). *OECD guideline for testing of chemicals: carcinogenicity studies*. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-451-carcinogenicity-studies_9789264071186-en. Acesso em: dez. 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (2015). *Guidance document on revisions to OECD genetic toxicology test guidelines*. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Genetic%20Toxicology%20Guidance%20Document%20Aug%2031%202015.pdf>. Acesso em: jan. 2017.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (2016). *OECD guideline for testing of chemicals: In vitro mammalian cell micronucleus test*. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en. Acesso em: jan. 2017.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas. Washington: Pan American Health Organization, 2006.

PAPADOPOULOU, M. V. et al. *Discovery of potent nitrotriazole-based antitrypanosomal agents: in vitro and in vivo evaluation*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 23, n. 19, p. 6467-6476, 2015.

PAPADOPOULOU, M. V. et al. *Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based compounds as potential anti-chagasic drugs: in vivo studies*. Future Science, v. 5, n. 15, p. 1763-1776, 2013.

PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas disease: coming to a place near you. Dermatologic Clinics, v. 29, n. 1, p. 53-62, 2011.

PATLEWICZ, G. Y.; FITZPATRICK, J. Current and future perspectives on the development, evaluation and application of in silico approaches for predicting toxicity. Chemical Research in Toxicology, v. 29, n. 4, p. 438-451, 2015.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. Trends in Parasitology, v. 30, n.6, p. 289-298, 2014.

PELKONEN, O. et al. *Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status*. Archives of Toxicology, v. 82, n. 10, p. 667-715, 2008.

PELLEGRINO, J. et al. Inquérito sobre a doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 49, p. 555-564, 1951.

PERIN, L. et al. Pharmacokinetic and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 61, n. 4, p. e02410-e02416, 2017.

PESSAYRE, D. et al. Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. Handbook of Experimental Pharmacology, v. 196, p. 311-365, 2010.

PODANY, A. T.; SWINDELL, S. Current strategies to treat tuberculosis. F1000research, 2016.

POLI, P. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of Megazol, an anti-Chagas disease drug, assessed by diferente short-term tests. Biochemical Pharmacology, v. 64, n. 11, p. 1617-1627. 2002.

PONCE, I. et al. A flap endonuclease (TcFEN1) is involved in *Trypanosoma cruzi* cell proliferation, DNA repair, and parasite survival. Journal of Cellular Biochemistry, 2016.

POORRAJAB, F. et al. *Nitroimidazolyl-1,3,4-thiadiazole-based anti-leishmanial agents: synthesis and in vitro biological evaluation*. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 44, n. 4, p. 1758-1762, 2009.

PORWOLLIK, S. et al. The Delta *uvrB* mutations in the Ames strains of *Salmonella* span 15 to 119 genes. Mutation Research, v. 483, n. 1-2, p. 1-11, 2001.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Infectious Diseases, v. 1, n.2, p. 92-100, 2001.

PURCHASE, I. F. International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC working paper 2/6. An appraisal of predictive tests for carcinogenicity. Mutation Research, v. 99, n. 1, p. 53-117, 1982.

PUROHIT, V.; BASU, A. K. Mutagenicity of nitroaromatic compounds. Chemical Research in Toxicology, v. 13, n. 8, p. 673-692, 2000.

PYTELA, R.; PIERSCHBACCHER, M. D.; RUOSLAHTI, E. A 15/115 kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the Arg-Gly-Asp adhesion sequence derived from fibronectin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 82, n. 17, p. 5766-5770, 1985.

QUARESMA, B. M. C. S. Síntese e avaliação tripanomicida e mutagênica de novos nitroimidazóis substituídos com diferentes anéis azólicos. 2015. 291f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Química Medicinal) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

RAMKUMAR, S.; RAGHUNATH, A.; RAGHUNATH, S. *Statin therapy: review of safety and potential side effects*. Acta Cardiologica Sinica, v. 32, n. 6, p. 631-639, 2016.

RASSI Jr., A.; RASSI, S.; RASSI, A. Sudden death in Chagas' disease. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 76, n. 1, p. 75-96, 2001.

RASSI, A. J.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. Lancet, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RAYNAL, P. R.; POLLARD, H. B. *Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene Family of multi-functional calcium- and phospholipid-binding proteins*. Biochimica et Biophysica acta, v. 1197, n. 1, p. 63-93, 1994.

RENDIC, S.; GUENGERICH, F. P. Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. Chemical Research in Toxicology, v. 25, n. 7, p. 1316-1383, 2012.

REY, L. *Tripanossomíase por Trypanosoma cruzi (Doença de Chagas): O Parasito*. In: Rey L. Parasitologia. 3 ed., o. 151-159, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, A. L. et al. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. American Heart Journal, v. 141, n. 2, p. 260-265, 2001.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. *Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 31, n. 3, p. 301-314, 1998.

RIGALLI, J. P. et al. *Regulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in HepG2 cells: involvement of pregnane X-receptor*. PloS Neglected Tropical Diseases, v. 6, n. 12, p. e1951, 2012.

RISS, T. L et al. Cell viability Assays. In: Sittampalam G. S. *Assay Guidance Manual*. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.

ROE, F. J. Metronidazole: review of uses and toxicity. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 3, n. 3, p. 205-212, 1977.

ROE, F. J. Safety of nitroimidazoles. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, v. 46, p. 72-81, 1985.

ROE, F. J. Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. Surgery, v. 93, n. 1, p. 157-164, 1983.

RUBIO J. et al. Trypanocidal activity of oleoresin and terpenoids isolated from *Pinus oocarpa*. Journal of Biosciences, v. 60, n. 9-10, p. 711-716, 2005.

RUTTER, J.; WINGE, D. R.; SCHIFFMAN, J. D. Succinate dehydrogenase – assembly, regulation and role in human disease, Mitochondrion, v. 10, n. 4, p. 393-401, 2010.

SAITO, Y. et al. Synthesis of 1,2,3-triazolo-carbanucleoside analogues of ribavirin targeting an HCV in replicon. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 11, n. 17, p. 3633-3639, 2003.

SANTORO, G. F. et al. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (protozoa: Kinetoplastida). Parasitology, v. 134, p. 1679-1656, 2007.

SARAIVA, J. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Parasitology Research, v. 100, n. 4, p. 791-795, 2006.

SARKAR, S. et al. Chagas disease risk in Texas. Neglected Tropical Diseases, v. 4, n. 10, p. 836, 2010.

SAVILL, J. S. et al. Phagocytic recognition of cells undergoing apoptosis. Immunology Today, v. 14, n. 3, p. 131-136, 1993.

SCATENA, R. et al. *The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic*. American Journal of Physiology – Cell Physiology, v. 293, n. 1, p. C12-C21, 2007.

SCHIMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nature Protocols, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SCHMUNIS, G. A. *Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, n.1, p. 75-85, 2007.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. *Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem*. Acta Tropica, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, 2010.

SCHOONEN, W. G.; WESTERINK, W. M.; HORBACH, G. J. High-throughput screening for analysis of *in vitro* toxicity. EXS, v. 99, p. 401-452, 2009.

SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, n. 2, p. 52-63, 2011.

SILVESTRI, R. et al. *1-[2-(Diphenylmethoxy)ethyl]-2-methyl-5-nitroimidazole: a potent lead for the design of novel NNRTIs*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 10, n. 3, p. 253-256, 2000.

SILVESTRI, R. et al. Synthesis, biological evaluation, and binding mode of novel 1-[2-(diarylmethoxy)ethyl]-2-methyl-5-nitroimidazoles targeted at the HIV-1 reverse transcriptase. Journal of Medicinal Chemistry, v. 45, n. 8, p. 1567-1576, 2002.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. *Moléstia de Chagas e ecologia profunda: a “luta antivetorial” em questão*. Ciência & Saúde Coletiva, v. 16, n. 2, p. 677-687, 2011.

SKOLNIK, R.; AHMED, A. Ending the neglect of neglected tropical diseases. Disponível em: <http://www.prb.org/pdf10/neglectedtropicaldiseases.pdf>. Acesso em: dez. 2011.

SMITH, D. A. et al. *Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo*. Xenobiotica, v. 28, n. 2, p. 1095-1128, 1998.

SQUELLA, J. A.; BOLLO, S.; NUÑEZ-VERGARA, L. J. Recent developments in the electrochemistry of some nitro compounds of biological significance, v. 9, n. 5, p. 565-581, 2005.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. Expert Opinion on Investigational Drugs, v. 24, n. 1, p. 43-59, 2015.

SURH, Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. Mutation Research, v. 428, n. 1-2, p. 305-327, 1999.

TEIXEIRA, A.; NASCIMENTO, R.; STURM, N. *Evolution and pathology in Chagas disease: a review*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, n. 5, p. 463-491, 2006.

THOMPSON, T. N. Optimization of metabolic stability as a goal of modern drug design. Medicinal Research Reviews, v. 21, n. 5, p. 412-449, 2001.

TOLEDO, M. J. et al. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 53, n. 6, p. 1045-1053, 2004.

TOMINAGA, H. et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications*, v. 36, n. 47-50, 1999.

TRAINA, M. et al. Chagasic cardiomyopathy is associated with increased morbidity and mortality compared to nonischemic cardiomyopathy among latin american immigrants living in Los Angeles. *Circulation*, v. 126, n. 21, 2012.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 472-481, 2001.

URBINA, J. A. et al. *Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: in vitro and in vivo studies*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 7, p. 1771-1777, 1998.

URBINA, J. A. et al. *In vitro and in vivo activities of ravuconazole on Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 21, n. 1, p. 27-38, 2003a.

URBINA, J. A. et al. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 21, n. 1, p. 39-48, 2003b.

VARGAS, V. M.; MOTTA, V. E.; HENRIQUES, J. A. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Research*, v. 319, n. 1, p. 31-45, 1993.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, v. 243, p. 167-190, 2000.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of Immunological Methods*, v. 184, p. 39-51, 1995.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. *Caderno da Saúde Pública*, v. 16, p. 7-12, 2000.

VINKEN, M.; BLAAUBOER, B. J. *In vitro testing of basal cytotoxicity: establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death*. *Toxicology in Vitro*, v. 39, p. 104-110, 2017.

VIODÉ, C. et al. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochemical Pharmacology*, v. 57, n. 5, p. 549-557, 1999.

WALSH, J. S. et al. Structural alterations that differentially affect the mutagenic and antitrichomonal activities of 5-nitroimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 30, n. 1, p. 150-156, 1987.

WALSH, J. S., MIWA, G. T. Bioactivation of drugs: risk and drug design. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 51, p. 145-167, 2011.

WANG, K.; GUENGERICH, F. P. Reduction of aromatic and heterocyclic aromatic *N*-hydroxylamines by human cytochrome P450 2S1. *Chemical Research in Toxicology*, v. 26, n. 6, p. 993-1004, 2013.

WATANABE, M.; ISHIDATE, M.; NOHMI, T. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Mutation Research*, v. 216, n. 4, p. 211-220, 1989.

WATANABE, M.; ISHIDATE, M.; NOHMI, T. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated *O*-acetyltransferase levels. *Mutation Research*, v. 234, n. 5, p. 337-348, 1990.

WARIS, G.; AHSAN, H. *Reactive oxygen species*: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, v. 14, p. 1-8, 2006.

WINKELMANN, E. et al. Chemotherapeutically active nitro compounds. 4. 5-Nitroimidazoles (Part I). *Arzneimittel-forschung*, v. 27, n. 12, p. 2251-2263, 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). *Control of chagas disease*: second report of the WHO expert committee. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf. Acesso em: dez. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2007). Global plan to combat neglected tropical diseases 2008-2015. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_2007.3_eng.pdf. Acesso em: dez. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf. Acesso em: dez. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report in neglected tropical diseases. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/. Acesso em: jan. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015). *Chagas disease in Latin America*: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly epidemiological record*. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf>. Acesso em: jan. 2017.

WORLD OF HEALT ORGANIZATION (2006). Strategic and technical meeting on intensified control of neglected tropical diseases - Report of an international workshop. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_2006.1_eng.pdf. Acesso em: dez. 2011.

YAMAZAKI, H. et al. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of *N*-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis*, v. 13, n. 1789-1794, 1992.

YIN L. et al. Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*, v. 10, n. 1, p. 68-72, 2013.

YUN, O. et al. *Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontières*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 7, p. e488, 2009.

ZANGER, U. M. et al. Genetics, epigenetics and regulation of drug metabolizing cytochrome P450 enzymes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 95, n. 3, p. 258-261, 2014.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. *Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation*. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 138, p. 103-141, 2013.

ZEIGER, E.; CHHABRA, R. S.; MARGOLIN, B. H. Effects of the hepatic S9 fraction from aroclor-1254-treated rats on the mutagenicity of benzo[alpha]pyrene and 2-aminoanthracene in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Research*, v. 64, n. 6, p. 379-389, 1979.

ZHANG, W. et al. Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 30, p. 314-318, 2002.

ZHU, B. T. *On the general mechanism of selective induction of cytochrome P450 enzymes by chemicals: some theoretical considerations*. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 6, n. 4, p. 486-494, 2010.

ZINGALES, B. et al. Drug Discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 6, p. 828-833, 2014.

ZINGALES, B. et al. *The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas?* *Revista da Biologia*, v. 6b, p. 44-48, 2011.