



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

Francisco do Vale Chaves e Mello

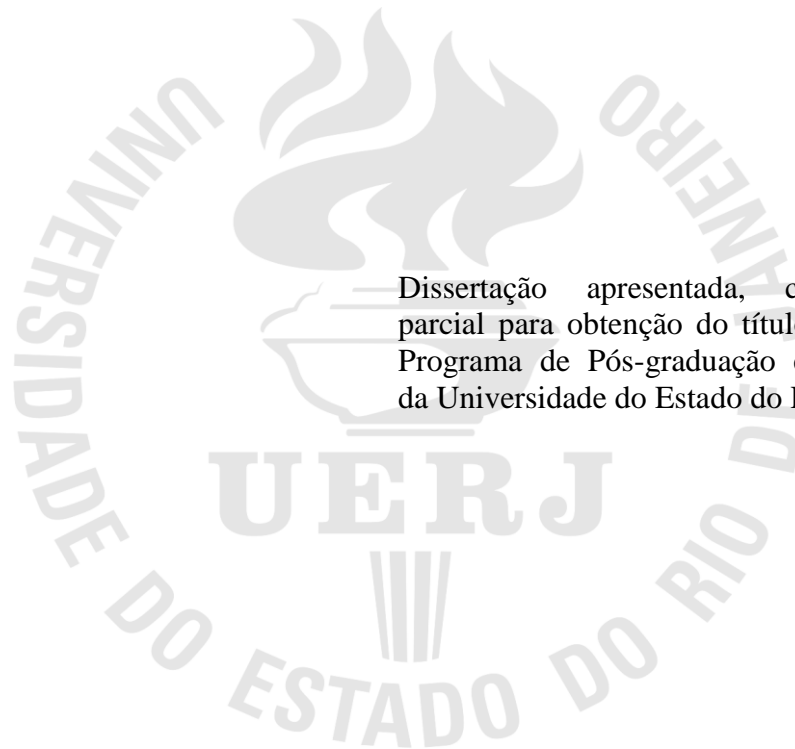
Avaliação citotóxica, mutagênica e genotóxica dos análogos do Megazol

Rio de Janeiro

2012

Francisco do Vale Chaves e Mello

Avaliação citotóxica, mutagênica e genotóxica dos análogos do Megazol



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador : Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Coorientadora: Prof. Dra. Claudia Alessandra Aiub

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M527 Mello, Francisco do Vale Chaves e.
Avaliação citotóxica, mutagênica e genotóxica dos análogos do
Megazol / Francisco do Vale Chaves e Mello. – 2012.
85f. : il.

Orientador: Israel Felzenszwalb.
Coorientadora: Prof. Dra. Claudia Alessandra Aiub

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. *Leishmania* – Teses. 2. Antígenos – Teses. I. Felzenszwalb, Israel. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.993.161

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

Assinatura

Data

Francisco do Vale Chaves e Mello

Avaliação citotóxica, mutagênica e genotóxica dos análogos do Megazol

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 31 de maio de 2012.

Orientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: Prof. Dra. Claudia Alessandra Aiub

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Cristina Paes

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Alcione Silva de Carvalho

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2012

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Israel Felzenszwalb por ter me acolhido como aluno e investido em minha formação.

À professora e orientadora Cláudia Aiub por este projeto, pelos ensinamentos e pelo exemplo de pessoa batalhadora.

À professora e orientadora Nubia Boechat por este projeto e todo suporte necessário para que ele tenha transcorrido perfeitamente.

À pesquisadora Alcione Carvalho por toda atenção, paciência e conhecimento fornecido no entendimento químico do projeto.

Ao meu pai, mãe e irmão.

A todos os amigos e companheiros de trabalho do LABMUT – Andréia Fernandes, Andrea Kaezer, Alessandra, Mazzei - por terem acompanhado e participado no desenvolvimento deste projeto: nada seria possível sem a ajuda de vocês. Em especial, ao Raphael Carpes, pela insistência em fazer cada metodologia dar certo. À Claudia Rainho, colega e amiga nas aulas, apresentações, expectativas, participação nos projetos sociais, nestes 2 anos de mestrado.

Aos colegas e professores do Departamento de Bioquímica, especialmente a Jéssica, por colaborarem e fornecerem material necessário para o desenvolvimento deste projeto.

Aos professores membros da banca avaliadora por se disponibilizarem a avaliar e contribuir com este projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências da UERJ, funcionários e professores por terem participado da minha formação.

Aos amigos de toda uma vida: Luana Gomes, Ricardo Cosentino, Leandro Moita, Kamila Amador, Caroline Artini, Bárbara Barbosa,

Ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo suporte financeiro e científico.

E principalmente a todos os meus grandes amigos, em especial a turma Bio Uerj 2005/1: Viviane Mignone, Felipe Jardim, Rafaela Aires, Danielle Borim, Piatã Marques, Paula Martins, Aline Oliveira, Leonardo Freire, Ivan Vasquez, Marlon Almeida, Giselle Machado, Camila Cupello, Luciana Fiuza, Valda Nogueira, Fábio Bastos. Amo vocês.

Eu que já não sou assim muito de ganhar
Junto às mãos ao meu redor
Faço o melhor que sou capaz
Só para viver em paz

Marcelo Camelo

RESUMO

MELLO, Francisco do Vale Chaves e. *Avaliação citotóxica, mutagênica e genotóxica dos análogos do Megazol*. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A doença de Chagas é uma doença tropical infecciosa e negligenciada responsável por um grande número de pessoas infectadas e em risco de infecção, principalmente nas regiões pobres da América Latina. No momento, apenas duas drogas, Benzonidazol e Nifurtimox, estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, mas são ineficazes por apresentarem baixa taxa de cura. O Megazol é um importante representante da classe dos nitroimidazóis e é uma alternativa promissora devido ao seu potencial tripanocida com um perfil superior de ação quando comparado ao tratamento disponível. No entanto, o Megazol não é utilizado clinicamente uma vez que possui atividade mutagênica e carcinogênica relatada. O Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) desenvolveu três análogos do Megazol: PTAL 05-02 (3-amino-5-(1-metil-5-nitro-1H-imidazol-2-il)-1H-1,2,4-triazol), PAMT 09 (2-amino-N-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-5-(trifluorometil)-1H-1,2,4-triazol) e PTAL 04-09 (1-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-1H-pirazol). O objetivo deste trabalho é apresentar novas moléculas análogas do Megazol com atividade tripanocida, desenvolvidas a partir de estratégias racionais de desenvolvimento de substâncias bioativas ao manter o perfil farmacodinâmico do Megazol enquanto tenta diminuir ou remover o efeito genotóxico. Testes genotóxicos na avaliação segura de novas substâncias bioativas foram utilizados, de acordo com as diretrizes da OECD. O teste da *Salmonella*/microsoma foi utilizado na avaliação mutagênica e citotóxica, utilizando linhagens de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, deficientes e supercompetentes na síntese de enzimas nitroreductase e acetiltransferase. O análogo PAMT 09 não foi mutagênico em nenhuma concentração e linhagem utilizada. Os análogos PTAL 05-02 e PTAL 04-09 foram mutagênicos, na ausência de S9 mix, para a linhagem TA98/1,8-DNP₆. Na avaliação de citotoxicidade, os três análogos foram citotóxicos, independente de metabolização exógena S9 mix. O teste do micronúcleo, utilizando células de macrófago de rato, foi realizado para a avaliação genotóxica dos análogos do Megazol. Os três análogos foram capazes de induzir a formação de micronúcleos e apresentaram efeito citotóxico.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Megazol. Teste da *Salmonella*/microsoma. Teste do Micronúcleo.

ABSTRACT

MELLO, Francisco do Vale Chaves e. *Cytotoxic, mutagenic and genotoxic evaluation of Megazol analogs*. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Chagas' disease is an infectious neglected tropical disease responsible for a large number of infected people and at risk for infection, mainly in poor areas of Latin America. At the moment, there are just two drugs, Benznidazol and Nifurtimox, available for the Chagas disease treatment, but they are ineffective since they have low cure rates. Megazol is an important representative of nitroimidazole class and it is a promising alternative because of its trypanocidal activity with a superior profile of action compared to the available treatment for Chagas' disease. However, Megazol is not used clinically since its mutagenic and carcinogenic activity was reported. The Institute of Pharmaceutical Technology (Farmanguinhos) has designed 3 analogues from Megazol: PTAL 05-02 (2-amine-5-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazole-2-yl)-1H-1,2,4-triazole), PAMT 09 (2-amine-N-(1-methyl-4-nitro-1H-imidazole-5-yl)-5-(trifluoromethyl)-1H-1,2,4-triazole) and PTAL 04-09 (1-(1-methyl-4-nitro-1H-imidazole-5-yl)-1H-pirazole). The aim of this work is to present new Megazol analogous molecules with trypanocidal activity, similar pharmacodynamic profile and less or none genotoxic effect developed using strategies of rational drug design. Genotoxic Tests for the safe evaluation of new bioactive substances were used, according to OECD guidelines. The *Salmonella*/microsoma test was used in the mutagenic and citotoxic evaluation using *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains lacking and overproducing nitroreductases and acetyltransferases enzymes. The PAMT 09 analogue was not mutagenic in any concentration and strain used. The PTAL 05-02 and PTAL 04-09 analogues was mutagenic, in the absence of S9 mix, to the TA98/1,8-DNP₆ strain. In the citotoxic evaluation, the three analogues were citotoxic, with and without S9 mix. The micronucleus test using rat macrophage cells was used in the genotoxic evaluation of Megazol analogous. The three analogues were capable of induce the micronuclei formation and showed citotoxic effect.

Keywords: Chagas' disease. Megazol. *Salmonella*/microsoma test. Micronucleus test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> e suas formas evolutivas.....	20
Figura 2 –	Fórmula estrutural do Nifurtimox.....	26
Figura 3 –	Fórmula estrutural do Benzonidazol.....	26
Figura 4 –	Fórmula estrutural do Metronidazol.....	31
Figura 5 –	Fórmula estrutural do Megazol.....	32
Figura 6 –	Resumo da síntese do análogo PTAL 05-02.....	35
Figura 7 –	Resumo da síntese do análogo PAMT 09.....	36
Figura 8 –	Resumo da síntese do análogo PTAL 04-09.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Fórmulas estruturais, fórmulas condensadas e pesos moleculares dos análogos do Megazol.....	44
Quadro 2 –	Relação das linhagens de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium derivadas de LT1 utilizadas nos testes quantitativo e qualitativo de mutagenicidade e toxicidade e suas respectivas características genotípicas.....	47
Quadro 3 –	Equivalência entre a concentração inicial, massa final e massa molecular utilizada pelos análogos do Megazol no teste quantitativo de mutagenicidade.....	50
Quadro 4 –	Equivalência entre a concentração inicial, massa final e massa molecular utilizada pelos análogos do Megazol no teste do micronúcleo.....	52
Quadro 5 –	Correlação dos valores de IC ₅₀ com as concentrações mínimas mutagênicas e citotóxicas, e concentrações máximas não mutagênicas e citotóxicas do Megazol e seus análogos utilizadas no tratamento das linhagens padrão de <i>S. enterica</i>	69
Quadro 6 –	Correlação dos valores de IC ₅₀ com as concentrações mínimas mutagênicas e citotóxicas, e concentrações máximas não mutagênicas e citotóxicas do Megazol e seus análogos utilizadas no tratamento das linhagens de <i>S. enterica</i> deficientes e supercompetentes na síntese de nitroreduases e acetiltransferases.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Teste de mutagenicidade com cepas de <i>S. enterica</i> TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 05-02.....	54
Tabela 2 –	Teste de mutagenicidade com cepas de <i>S. enterica</i> TA98 e suas derivadas TA98NR, YG1021, TA98/1,8-DNP ₆ e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 05-02.....	55
Tabela 3 –	Teste de mutagenicidade com cepas de <i>S. enterica</i> TA100 e suas derivadas TA100NR, TA1535 e TA1535NR, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 05-02.....	56
Tabela 4 –	Teste do micronúcleo com macrófagos RAW 264,7 utilizando o análogo do Megazol PTAL 05-02.....	57
Tabela 5 –	Teste de mutagenicidade com cepas de <i>S. enterica</i> TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PAMT 09.....	58
Tabela 6 –	Teste de mutagenicidade com cepas de <i>S. enterica</i> TA98 e suas derivadas TA98NR, YG1021, TA98/1,8-DNP ₆ e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PAMT 09.....	60
Tabela 7 –	Teste de mutagenicidade com cepas de <i>S. enterica</i> TA100 e suas derivadas TA100NR, TA1535 e TA1535NR, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PAMT 09.....	61
Tabela 8 –	Teste do micronúcleo com macrófagos RAW 264,7 utilizando o análogo do Megazol PAMT 09.....	62
Tabela 9 –	Teste de mutagenicidade com cepas de <i>S. enterica</i> TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 04-09.....	63
Tabela 10 –	Teste de mutagenicidade com cepas de <i>S. enterica</i> TA98 e suas derivadas TA98NR, YG1021, TA98/1,8-DNP ₆ e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 04-09.....	65
Tabela 11 –	Teste de mutagenicidade com cepas de <i>S. enterica</i> TA100 e suas derivadas TA100NR, TA1535 e TA1535NR, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 04-09.....	66

Tabela 12 – Teste do micronúcleo com macrófagos RAW 264,7 utilizando o análogo do Megazol PTAL 04-09.....	67
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2AA	2-aminoantraceno
2AF	2-aminofluoreno
4NQO	4-nitroquinolina- <i>N</i> -óxido
Apop.	Apoptose
AS	Azida sódica
BNZ	Benzonidazol
CP	Controle positivo
CYP	Citrocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
DTI	Doenças tropicais infecciosas
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
I.M.	Índice de mutagenicidade
I.Mi.	Índice mitótico
MitC	Mitomicina-C
MNNG	Metil nitro nitroso de guanidina
MTZ	Metronidazol
Necr.	Necrose
NF	Nifurtimox
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OPM	Orbitações por minuto
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
REN	Reparo por excisão de nucleotídeos
RNA	Ácido ribonucleico
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNP	Sistema nervoso periférico

Sobr.

T. cruzi

Sobrevivência

Trypanosoma cruzi

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	DOENÇA DE CHAGAS.....	17
1.1	Etiologia e epidemiologia da doença de Chagas.....	17
1.1.1	<u>Ocorrência.....</u>	17
1.1.2	<u>Biologia do <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</u>	19
1.1.3	<u>Os vetores triatomíneos e outros meios de transmissão.....</u>	21
1.2	Manifestação clínica.....	22
1.2.1	<u>Fase aguda.....</u>	22
1.2.2	<u>Fase crônica indeterminada.....</u>	23
1.2.3	<u>Fase crônica determinada.....</u>	24
1.2.4	<u>Tratamento.....</u>	25
2	NOVAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM DESENVOLVIMENTO.....	28
2.1	Novas substâncias bioativas e metas de desenvolvimento.....	28
2.2	Nitroimidazol.....	29
2.3	Megazol.....	31
2.4	Análogos do Megazol.....	33
2.4.1	<u>Desenvolvimento racional de novas substâncias bioativas.....</u>	33
2.4.2	<u>PTAL 05-02.....</u>	35
2.4.3	<u>PAMT 09.....</u>	36
2.4.4	<u>PTAL 04-09.....</u>	37
3	TESTES GENOTÓXICOS NA AVALIAÇÃO SEGURA DE NOVAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	38
3.1	Órgãos regulatórios.....	38
3.2	Testes genotóxicos na avaliação de novos fármacos.....	38
3.3	Indução de mutação reversa bacteriana (teste da <i>Salmonella</i>/microsoma ou teste de Ames).....	40
3.4	Teste <i>in vitro</i> do micronúcleo com células de mamíferos.....	42
4	OBJETIVOS.....	43
4.1	Geral.....	43
4.2	Específicos.....	43
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	44

5.1	Preparo e diluição dos análogos do Megazol	44
5.2	Presença de metabolização exógena	45
5.3	Teste da mutação reversa bacteriana (<i>Salmonella</i>/microsoma ou teste de Ames)	45
5.3.1	<u>Linhagens de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium</u>	45
5.3.2	<u>Controle negativo e positivo</u>	48
5.3.3	<u>Teste quantitativo de mutagenicidade e citotoxicidade (com pré-incubação)</u>	48
5.4	Teste <i>in vitro</i> do micronúcleo com macrófago RAW 264,7	50
6	RESULTADOS	53
6.1	PTAL 05-02	53
6.1.1	<u>Teste quantitativo de mutagenicidade e citotoxicidade</u>	53
6.1.2	<u>Teste <i>in vitro</i> do micronúcleo com macrófago RAW 264,7</u>	57
6.2	PAMT 09	57
6.2.1	<u>Teste quantitativo de mutagenicidade e citotoxicidade</u>	57
6.2.2	<u>Teste <i>in vitro</i> do micronúcleo com macrófago RAW 264,7</u>	64
6.3	PTAL 04-09	62
6.3.1	<u>Teste quantitativo de mutagenicidade e citotoxicidade</u>	62
6.3.2	<u>Teste <i>in vitro</i> do micronúcleo com macrófago RAW 264,7</u>	67
7	DISCUSSÃO	68
	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE - Teste de mutagenicidade com cepas de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium TA97, TA98, TA100 e TA102 na presença e ausência de S9 mix, com Megazol.....	85

INTRODUÇÃO

As doenças tropicais infecciosas (DTI) pertencem ao grupo de patologias presente nas regiões mais pobres de países em desenvolvimento. São causadas por inúmeros agentes infecciosos como vírus, bactérias e protozoários. Doenças como hanseníase, esquistossomose, leishmaniose, doença do sono (tripanossomíase africana), doença de Chagas (tripanossomíase americana), entre outras, são exemplos deste conjunto de enfermidades (BEYER et al., 2007; DIAS; PRATA; CORREIA, 2008).

As DTI também são classificadas como doenças negligenciadas por serem características das populações mais pobres e, principalmente, por não atingirem da mesma forma países desenvolvidos, além de receberem menor atenção das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de fármacos, da mídia e das ciências médicas quando comparadas a outras doenças, como a HIV/AIDS (EHRENBERG; AULT, 2005).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas são afetadas por pelo menos uma DTI. Outros milhões de indivíduos estão em risco de infecção em 149 países e territórios onde as DTI são endêmicas. Destes países, trinta apresentam áreas endêmicas de seis tipos diferentes de DTI (WHO, 2010).

A pobreza é apenas a causa inicial para o surgimento e ascensão das DTI. A manutenção destas doenças é consequência das precárias condições sociais, da pressão econômica do homem na investida em novas áreas rurais e de selva, da falta de investimento em saúde pública e pesquisa e, em determinados países, resultante de guerras internas e outros conflitos (BEYER et al., 2007; SKOLNIK; AHMED, 2010).

As consequências para a população afetada são mais graves. Os indivíduos doentes perdem a capacidade de produzir, prejudicando a economia familiar e a do país em que vivem. A qualidade de vida, já precária, se torna ainda mais decadente. A discriminação e o estigma estão presentes e contribuem para o abandono social e do poder público. Além disto, o tratamento farmacológico disponível para muita destas doenças é ineficaz. Sem assistência adequada, a mortalidade é a resultante final (WHO, 2010). No entanto, nas últimas décadas, ocorreu uma maior atenção as DTI. A OMS, através de seus relatórios, estimulou e traçou metas para os governos a fim de controlar a incidência destas doenças (WHO, 2007).

Dentre estes relatórios, o *Plano Global de Combate as Doenças Tropicais Negligenciadas* apresenta estratégias de controle e combate que começaram em 2008 e que terminarão em 2015, e que são estruturadas de acordo com o relatório *Objetivos de*

Desenvolvimento do Milênio, das Nações Unidas. Estas medidas já beneficiaram milhares de indivíduos, protegendo-os da dor, instabilidade e pobreza, através do tratamento farmacológico e das intervenções socioeconômicas das nações afetadas (WHO, 2007; MOLYNEUX; MALECELA, 2011).

Na América Latina, incluindo o Brasil, há uma atenção especial a doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e responsável pela infecção de 10 milhões de pessoas que, além dos problemas sociais relacionados (WHO, 2007, 2010), carecem de um tratamento farmacológico eficaz, pois o atual medicamento disponível, Benzonidazol, apresenta baixas taxas de cura na fase crônica da doença e inúmeros efeitos colaterais (FERREIRA, 1990; BUSCHINI et al., 2007; JANNIN; VILLA, 2007; APT, 2010).

Portanto, há a necessidade do desenvolvimento de novas substâncias bioativas para o tratamento da doença de Chagas (POLI et al., 2002; WHO, 2006). Além disto, a segurança do uso destas substâncias deve ser garantida e avaliada através da avaliação mutagênica, citotóxica e genotóxica com a utilização de metodologias recomendadas (OECD, 1997, 2009, 2010).

1 DOENÇA DE CHAGAS

1.1 Etiologia e epidemiologia da doença de Chagas

1.1.1 Ocorrência

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, faz parte do grupo das doenças tropicais infecciosas e negligenciadas. É causada pelo protozoário parasita flagelado *Trypanosoma cruzi* e é predominantemente transmitida para o homem pelo grupo de insetos hematófagos da subfamília Triatominae, vetores da doença (PRATA, 2001).

Atinge extensas áreas das Américas com maior predominância nas áreas rurais pobres e de selva da América Latina, desde o México até o sul do Chile. No Brasil, há focos nos estados de Goiás, Minas Gerais, Tocantins, Rio Grande do Sul, Bahia, São Paulo, Piauí e Distrito Federal (VINHAS; DIAS, 2000; CARVALHO et al, 2002; MARTINS-MELO et al., 2012), além dos casos originários dos movimentos migratórios do campo em direção ao meio urbano e que se perpetuam pela transmissão da doença através da transfusão de sangue, da doação de órgãos e pela transmissão congênita (SCHMUNIS, 2007).

No entanto, há a presença e o risco de infecção em países desenvolvidos. Em regiões ao sul dos Estados Unidos, há áreas endêmicas devido a presença de vetores da doença (SARKAR et al., 2010). Os insetos triatomíneos são abundantes em alguns estados como do Arizona. Estudos confirmaram que 41% dos insetos coletados nessa região estavam infectados pelo *T.cruzi*, comprovando que o risco da população se contaminar nos Estados Unidos é maior do que se pensava. Além disto, nos estados onde uma grande parcela da população latina imigrante vive, como Califórnia, Texas, Flórida e Nova Iorque, foram constatados que 800 doadores de sangue estavam infectados com o parasita (PARKER; SETHI, 2011).

A imigração de indivíduos chagásicos para áreas não endêmicas e sem o vetor, como Europa e Ásia, também se tornou um problema de saúde nestas nações (VINHAS; DIAS, 2000; PRATA, 2001; SCHUMUNIS; YADON, 2010). Somente na Europa, estima-se que haja de 59 a 108 mil casos da doença de Chagas (WHO, 2010). Países como Portugal, Espanha e Itália, que até a década de 1940 eram países de origem de imigrantes com destino a

América Latina, se tornaram países destinos a partir da década de 1970 (PADILHA; PEIXOTO, 2007). E são estes países que apresentam os maiores índices de imigrantes latinos dentro da Europa e, por consequência, índices alarmantes de indivíduos chagásicos (WHO, 2010; ANGHEBEN et al., 2011).

Estima-se que 18 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*, sendo a maior parte na América Latina (WHO, 2010; MARTINS-MELO et al., 2012). Além disto, de acordo com a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS), 109 milhões de pessoas estariam em risco de infecção (WHO, 2010). Dados estimam que apenas em 2008, a doença de Chagas matou mais de 10 mil pessoas (ARMAGANIJAN; MORILLO, 2010; WHO, 2010). No Brasil, a doença é a quarta causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias nas faixas etárias acima de 45 anos (ANDREOLLO; MALAFAIA, 2009).

A infecção pelo *T. cruzi* na natureza constitui o ciclo selvagem do parasita e ocorre há milhões de anos. Evidências da existência da doença 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, somente nas últimas décadas, por motivos econômicos, sociais e ecológicos, o homem se tornou alvo de infecção ao se incluir no ciclo epidemiológico da doença. A infecção evoluiu de uma zoonose entre os animais do ciclo selvagem para uma antropozoonose (COURA; DIAS, 2009).

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, por consequência, a diminuição da quantidade de animais silvestres que constituem fonte alimentar para os triatomíneos, contribuíram para a domiciliação do inseto (COURA; DIAS, 2009).

Além do desequilíbrio ecológico nas inúmeras regiões da América Latina, há também a questão social ligada à origem e ao desenvolvimento da doença. 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).

1.1.2 Biologia do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* está presente na natureza em diferentes nichos ecológicos do ambiente silvestre. Desde troncos, copa de grandes árvores até rios e ambientes subterrâneos, através da infecção de seres vivos que constituem reservatórios naturais (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2008). Dentre eles estão marsupiais, roedores, aves, edentados, mamíferos, além dos próprios insetos triatomíneos, formando o grupo de mais de 100 seres vivos selvagens que o *T. cruzi* é capaz de parasitar e que participam do ciclo selvagem do parasita. Animais domésticos como cachorro, camundongo, porco, caprinos, também podem ser alvos do parasita, participando do ciclo doméstico do protozoário (COURA; DIAS, 2009).

Existem diversas linhagens do protozoário *T. cruzi* que se diferenciam em termos epidemiológicos, patogênicos, imunológicos, de resposta ao tratamento e na ação bioquímica (PRATA, 2001). Devido a estas particularidades, e na tentativa de melhorar o entendimento da biologia do parasita, há a divisão da espécie em seis grupos (*T. cruzi* I-VI) que se relacionam com a sua localidade, a via de infecção (vetor) e tipo de lesão gerada em humanos (ZINGALES et al., 2009).

O grupo *T. cruzi* I tem maior prevalência em pacientes do México, América Central, países do norte da América do Sul e Amazônia, e está mais associado à forma assintomática da doença e a manifestações clínicas cardíacas. Os demais grupos (*T. cruzi* II-VI) apresentam distribuição geográfica distinta pelo restante da América do Sul. No Brasil, o grupo de maior prevalência é o *T. cruzi* II, mais associado a manifestações clínicas cardíacas e digestórias (CARRANZA et al., 2009; ZINGALES, 2011).

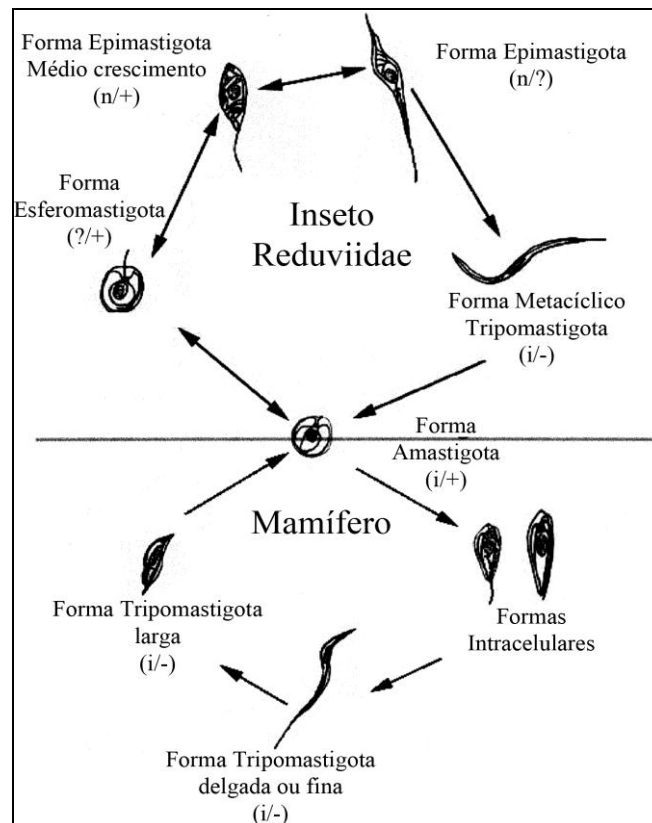
O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (figura 1) envolvido na doença foi descrito pelo médico pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909, que iniciou os estudos relacionados à biologia do parasita. O ciclo termina e se inicia no sangue do reservatório animal contaminado, no ciclo selvagem, ou do ser humano, no ciclo doméstico.

Existem duas formas do protozoário presente na corrente sanguínea destes animais. A forma tripomastigota representa 90% da população. Os 10% restantes estão na forma amastigota. O inseto, ao se alimentar desse sangue, se infecta (ANDREWS et al., 1987; LEY et al., 1988).

No intestino médio do triatomíneo, o parasita se diferencia da forma tripomastigota para a forma epimastigota. Esta última forma é altamente proliferativa. Na parede do canal posterior do intestino do inseto, o parasita se diferencia na forma tripomastigota metacíclico.

Este, por fim, é excretado nas fezes do triatomíneo enquanto este se alimenta (TYLER; ENGMAN, 2001). O contato destas fezes contaminadas com o sangue no ser humano é o meio mais importante de contágio da doença de Chagas. Esta via representa 70% dos casos de contaminação nos países onde não há programas de controle e combate ao vetor (COURA; DIAS, 2009).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e suas formas evolutivas



Fonte: TYLER; ENGMAN, 2001.

A forma tripomastigota do *T. cruzi* é capaz de parasitar inúmeras células nucleadas de mamíferos. Invadindo a célula, diferencia-se na forma amastigota e se prolifera por todo citoplasma formando pseudo-cistos. Quando a população intracelular aumenta, o protozoário se diferencia em tripomastigota e pode seguir na corrente sanguínea ou na linfática a fim de parasitar outras células. Desta forma, o triatomíneo então pode recomençar o ciclo ao se alimentar deste sangue contaminado (TYLER; ENGMAN, 2001).

1.1.3 Os vetores triatomíneos e outros meios de transmissão

Os vetores do *T. cruzi* 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 no ser humano. E eles estão presentes por toda América Latina (WHO, 2002).

As diversas espécies apresentam uma variada adaptação ao ambiente em que vivem. Fatores como clima, temperatura, umidade e disponibilidade alimentícia compõem as peculiaridades de cada espécie. Graças a essas peculiaridades, atrelada às modificações ecológicas e sociais induzidas pelo homem, que as espécies vetores se adaptaram ao domicílio humano (WHO, 2002; COURA; DIAS, 2009).

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 microhabitats com características climáticas diferentes do ambiente externo. Algumas espécies conseguem tolerar uma grande variação nas condições climáticas seja pelas diferentes temperaturas (*Belminus laportei* e *Triatoma díspar*) ou umidade (*Triatoma breyeri*) (CARVALHO et al., 1998; WHO, 2002).

Devido a estas características, uma determinada espécie pode ser um vetor mais importante na transmissão da doença do que outro em determinado país e região. Estas características também podem definir o tipo de linhagem do *Trypanosoma* envolvido na transmissão assim como a manifestação clínica envolvida no processo (PRATA, 2001).

No Brasil, o principal representante triatomíneo envolvido na transmissão da doença é o *Triatoma infestans*, conhecido popularmente como barbeiro. Há ocorrência desta espécie em mais de 720 municípios brasileiros (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2008). Outras espécies como o *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* também estão presentes na transmissão da doença no Brasil (VINHAES; DIAS, 2000; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2008).

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 passa por cinco fases ninfais antes de alcançar o estágio adulto. Este período leva em torno de seis meses e a alimentação a

base de sangue é importante para seu desenvolvimento. A alimentação ocorre ao anoitecer e ao amanhecer, pois são insetos com atividade noturna (WHO, 2002).

A transmissão da doença pelo vetor é uma das vias mais importantes. No entanto, existem outras vias de transmissão que participam na manutenção da doença na população urbana, além de representarem riscos a áreas não endêmicas e sem vetor, consequência da migração de pessoas contaminadas (WHO, 2010; ANGHEBEN et al., 2011).

A transfusão de sangue, a transmissão oral pelo alimento contaminado, a transmissão congênita (vertical), o transplante de órgãos, o acidente laboratorial, são exemplos alternativos das vias pelas quais a doença de Chagas pode ser transmitida. Em países onde não há controle dos bancos de sangue e dos órgãos transplantados, essas vias podem representar cerca de 20% dos meios de transmissão, como na Bolívia. A transmissão congênita pode variar de região a região e pode representar de 0,5 a 10% dos casos presentes na Bolívia, Chile e Paraguai (COURA; DIAS, 2009).

A partir do momento que ocorre a transmissão, em sua maioria através do vetor triatomíneo, a doença é dividida em dois estágios: fase aguda e fase crônica, sendo esta última dividida em indeterminada e determinada. Os sintomas marcantes de cada fase podem se desenvolver imediatamente ou não, assim como podem passar despercebidas caso se manifestem de forma branda. Em muitos casos, podem levar anos para se manifestarem ou não ocorrerem pelo resto da vida do indivíduo infectado (WHO, 2002, 2010).

1.2 Manifestação clínica

1.2.1 Fase aguda

A inflamação local marca a entrada do *Trypanosoma* no corpo do hospedeiro humano, quando este evento ocorre pela transmissão vetorial. Em seguida, devido à infecção generalizada, pode ocorrer o aparecimento de febre, taquicardia, edema, mal-estar, diarreia, vômito, anorexia, hepatomegalia, entre outros. Estes sintomas são comuns a outras vias de transmissão como na transfusão de sangue ou órgão contaminado. No entanto, podem ser ausentes na transmissão congênita, tornando-se um risco maior para o recém-nascido (PRATA, 2001; PARKER; SETHI, 2011).

As manifestações clínicas desta 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 (PRATA, 2001; WHO, 2002; PARKER; SETHI, 2011).

Quando se desconfia da infecção e/ou os sintomas estão presentes, o diagnóstico pelos testes parasitológicos é possível. Como o parasita está bem disseminado no sangue, ele pode ser facilmente detectado pela análise direta do sangue. A confirmação do diagnóstico também pode ser feita pelo eletrocardiograma e raios-X do tórax, que podem mostrar sinais do comprometimento cardíaco (PRATA, 2001; WHO, 2002).

Após o tempo de duração desta fase, os sintomas, quando presentes, desaparecem, sem aparente sequela (WHO, 2002).

1.2.2 Fase crônica indeterminada

A fase indeterminada segue após o desaparecimento dos sintomas da fase aguda. É marcada pela ausência de manifestações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas de acometimento cardíaco e digestivo. Estima-se que 50% da população chagásica se encontre nesta fase (ROCHA; RIBEIRO, 1998), e que de 50 a 70% dela permanecerá nesta condição pelo resto da vida (WHO, 2002).

No entanto, apesar do indivíduo não ter conhecimento do seu estado de saúde comprometido, testes como o PCR, sorologia e o xenodiagnóstico podem comprovar a infecção. Mas devido ao estado assintomático da doença ou de pequenos sinais presentes, e ao desconhecimento do paciente do significado deles, a aplicação destes testes não é considerada (PRATA, 2001).

O interesse científico na investigação de sinais da forma indeterminada levou ao desenvolvimento e análise de testes não invasivos cardiológicos e digestivos para caracterizar de forma mais exata este estágio da doença (RIBEIRO; ROCHA, 1998; PRATA, 2001).

A avaliação do sistema nervoso autônomo parassimpático e simpático demonstrou 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 disto, podem-se verificar processos fibróticos e lesões no sistema nervoso autônomo intracardíaco (RIBEIRO; ROCHA, 1998).

Apesar de uma pequena parcela dos pacientes apresentarem alguma anormalidade nestes testes mais específicos, o diagnóstico também pode estar presente em indivíduos sadios, comprometendo a validade dos resultados na caracterização da forma indeterminada da doença de Chagas (RIBEIRO; ROCHA, 1998; PRATA, 2001).

1.2.3 Fase crônica determinada

O tempo entre a fase indeterminada e a 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 podem estar comprometidos pelo parasita. Este estágio da doença 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). Estudos nas 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 desta forma por toda vida. No entanto, alguns destes 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). Além destas complicações, o risco de morte súbita é alto (BERN et al., 2007), atingindo 38% dos pacientes com insuficiência cardíaca (PRATA, 2001). As complicações cardíacas da doença de Chagas é a maior responsável pela mortalidade destes pacientes, respondendo por aproximadamente vinte e uma mil mortes por ano (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A doença de Chagas também promove dificuldades relacionadas ao sistema digestório. 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 colón (PRATA, 2001).

O sistema nervoso periférico (SNP) e autônomo (SNA) também podem sofrer danos. Cerca de 10% dos pacientes chagásicos 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).

1.2.4 Tratamento

A OMS estabelece que a droga ideal para o tratamento da doença de Chagas deve cumprir com os seguintes requerimentos: (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).

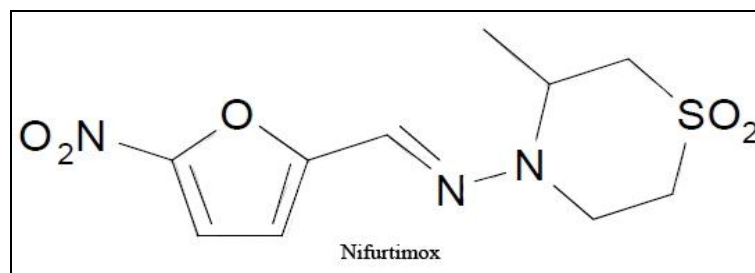
Atualmente, apenas duas drogas são recomendadas e estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: Nifurtimox (NF) e Benzonidazol (BNZ).

O Nifurtimox (Figura 2) é um nitrofurano (3-metil-4-[(5-nitrofurfuriledeno)-amino]-tiomorfolina-1,1-dióxido), lançado comercialmente em 1967, que age na geração de radicais livres pelas enzimas nitroredutases que, na presença do oxigênio, gera intermediários que são tóxicos ao DNA do *T. cruzi*, já que este é parcialmente deficiente nos mecanismos de detoxificação destes intermediários (COURA; CASTRO, 2002).

Ferreira (1961, 1962) e Ferreira, Prata e Rassi (1963) utilizaram pela primeira vez os nitrofuranos em pacientes na fase aguda alcançando bons resultados clínicos com alguns poucos efeitos colaterais e uma certa taxa de cura demonstrada pelo xenodiagnóstico. Na fase crônica, Coura et al. (1961a, 1961b, 1962) tratou os pacientes a longo prazo, mas suspendeu 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 2 - Fórmula estrutural do Nifurtimox

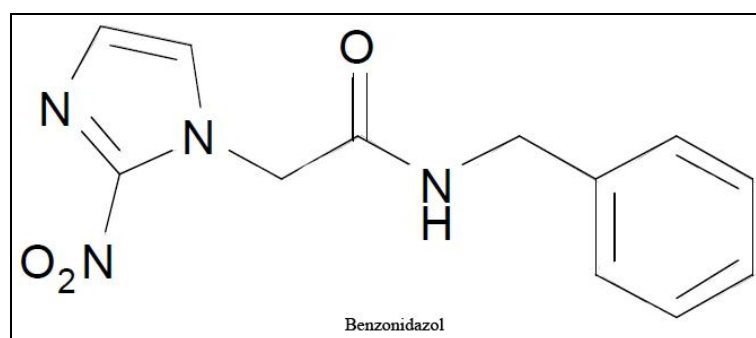


Fonte: GRAEBIN et al., 2009.

A utilização do NF foi suspensa na década de 1980 no Brasil, na Argentina, no Chile e no 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).

O Benzonidazol (figura 3) é um nitroimidazol (2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida), lançado comercialmente em 1972, que age inibindo a síntese proteica e a cadeia respiratória, e seus metabolitos estabelecem ligações covalentes com o DNA. Em comparação ao NF, gera menos radicais livres (APT, 2010).

Figura 3 - Fórmula estrutural do Benzonidazol



Fonte: GRAEBIN et al., 2009.

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 (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 sucesso na eliminação dos sintomas e na chance real de cura, além da tolerância dos pacientes aos efeitos colaterais. O tratamento apresenta boa eficácia na fase aguda da doença, com até 70% de chance de cura, principalmente em recém-nascidos e crianças, onde a chance de cura pode alcançar 100% (APT, 2010). Mas na fase crônica, esse índice cai para o intervalo entre 8 a 30% (FERREIRA, 1990; BUSCHINI et al., 2007; JANNIN; VILLA, 2007).

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 (CAMANDAROBA et al., 2003; TOLEDO et al., 2004; ZINGALES, 2011). Existem evidências de resistência natural ou maior sensibilidade de determinadas cepas aos medicamentos (FILARDI; BRENER, 1987). Dados epidemiológicos mostram uma maior sensibilidade do *T. cruzi* ao BNZ em países do cone norte (YUN et al., 2009). Outros estudos apontam que superexpressão ou deficiência de enzimas nitroreduases 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 (ZINGALES, 2011). Em consequência destas dificuldades, há a falta de consenso internacional quanto à escolha de um determinado medicamento em relação a um grupo de pacientes. A aplicação do tratamento deveria estar de acordo com a localização geográfica, faixa etária, estágio clínico da doença e o tipo infectante de *T. cruzi*. O único consenso é que o diagnóstico precoce da doença configura um bom prognóstico a ele (JANNIN; VILLA, 2007).

A OMS propõe, além do controle do vetor nas áreas endêmicas, (i) o acesso das drogas 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).

2 NOVAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM DESENVOLVIMENTO

2.1 Novas substâncias bioativas e metas de desenvolvimento

Os fármacos empregados no atual tratamento da doença de Chagas, Nifurtimox e Benzonidazol, geram significativos efeitos colaterais, pouca eficácia contra sintomas e baixa chance de cura, principalmente na fase mais crítica da doença. A comunidade científica e empresas farmacêuticas, nos últimos anos, têm aumentado seu interesse e esforço na pesquisa e síntese de novos compostos químicos para o tratamento (CLAYTON, 2010).

No desenvolvimento de novas substâncias bioativas, metas são estabelecidas de acordo com o conhecimento biológico do metabolismo do parasita durante a infecção a fim de se determinar uma atividade farmacológica de interesse. A forma amastigota intracelular do parasito é a forma proliferativa no hospedeiro vertebrado, e por isto, acredita-se que seja o alvo farmacológico mais importante. A ação na forma tripomastigota também é importante, pois elas derivam da forma amastigota, e há desenvolvimento de novas substâncias bioativas com este alvo farmacológico (ANDRADE et al., 2000; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006).

Atividade em diferentes linhagens do *T. cruzi* é importante para garantir a aplicabilidade do fármaco em diferentes regiões endêmicas da doença. Baixa interação com enzimas do citocromo P450 é necessária para evitar interação droga-droga, já que muitos pacientes utilizam medicamentos antiarrítmicos, anticoagulantes e outros. Baixa toxicidade, genotoxicidade e teratogenicidade também são exigências básicas no desenvolvimento de fármacos. O custo final do medicamento deve ser baixo para permitir a disponibilidade em áreas mais pobres (BUCKNER; NAVABI, 2010).

Dentro dos possíveis processos metabólicos, 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). Inibidores da cruzaina têm sido investigados e estão em estágio avançado de estudos pré-clínicos (BARR et al., 2005; MCKERROW et al., 2009).

A biossíntese do ergosterol é essencial na viabilidade celular e na proliferação do *T. cruzi*. Inibidores desta via são bons candidatos. Dentre eles, o grupo dos azoles, representado pelo composto Posaconazol, apresenta boa taxa de cura em camundongos na fase aguda e crônica da doença, agindo em linhagens resistentes ao BNZ e NF, com boa sinergia com

antiarrítmicos e atuando na eliminação da forma amastigota intracelular em células cardíacas (BENAIM et al., 2006; URBINA, 2009).

O *T. cruzi* não sintetiza enzimas como a catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, envolvidas no metabolismo das espécies reativas de oxigênio. No entanto, há a síntese de enzimas equivalentes, que são responsáveis pelo seu sistema de defesa antioxidante. A mais importante é a tripanotona reductase. Além desta, expressa outras enzimas responsáveis pela detoxificação de peróxidos e superóxidos (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, como os nitro-compostos (VIODÉ et al., 1999).

Produtos naturais também apresentam atividade contra o protozoário, 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 terpenóides 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).

2.2 Nitroimidazol

Os compostos do grupo nitroimidazol pertencem à classe dos compostos nitro-heterocíclicos, que são utilizados em inúmeras aplicações: da indústria alimentícia até os antibióticos. O grupo nitroimidazol é mais conhecido pelo seu poder bactericida em ambiente anaeróbico (CELIK; ARAS, 2006). Mas a sua aplicabilidade é estudada em outras áreas de interesse como no tratamento do câncer (ADAMS; STRATFORD, 1986; ADAMS, 1992; ADAMS; STRATFORD, 1994), no controle da fertilidade (KAPOOR et al., 2003), no tratamento da tuberculose (NAGARAJAN et al., 1989; GUNAY et al., 1999) e na inibição da enzima transcriptase reversa do vírus HIV (SILVESTRI et al., 2000; SILVESTRI et al., 2002).

Dentro deste grupo de compostos químicos, também está relatado o potencial tripanocida, principalmente do grupo 5-nitroimidazol, que pode ser de interesse no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças como a tripanossomíase americana e africana (BOUTEILLE et al., 1995; ENANGA et al., 1998; BOUTEILLE; CHAUVIERE, 1999; BUSCHINI et al., 2007).

No entanto, a maioria das substâncias do grupo 5-nitroimidazol tem efeito mutagênico e tóxico em bactérias. Esse efeito pode ser explicado pela presença de nitroredutases nestes organismos (MORAIS et al., 1998). A redução de um elétron nestes compostos leva a geração de um instável radical ânion 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 (MASON; JOSEPHY, 1985; EDWARDS, 1993). Na presença de oxigênio, o elétron do radical ânion nitro poderia ser sequestrado por ele regenerando o composto-fonte e formando superóxido, gerando um ciclo fútil (MITAL, 2009). 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 células de mamíferos foi relatada (POLI et al., 2002, NESSLANY et al., 2004).

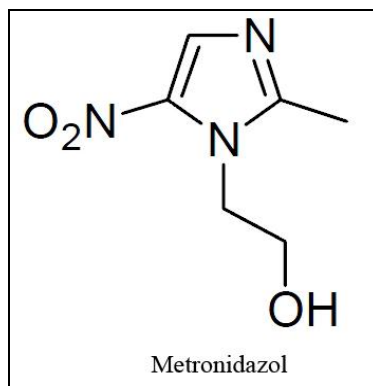
O nitroimidazol Metronidazol (1-hidroxetil-2-metil-5-nitroimidazole) (MTZ; figura 4) é um dos compostos mais estudado dentro deste grupo (MITAL, 2009). Ele é bem tolerado em ratos, sem apresentar toxicidade crônica em doses até 150 mg/kg, administradas até 80 semanas. Macacos ainda apresentaram menor sensibilidade em doses até 225 mg/kg, sem apresentar efeitos colaterais (ROE, 1977, 1983). Em humanos, o MTZ é bem tolerado, principalmente em mulheres grávidas. Está entre as drogas mais utilizadas por gestantes no mundo (ROE, 1985; MITAL, 2009).

O MTZ também é mutagênico nos testes bacteriológicos com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *Escherichia coli*, que são bactérias anaeróbicas facultativas. Em ambiente anaeróbico, há interação e ligação com o DNA, além de se observar quebras. No entanto, 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).

Teoricamente, todo nitroimidazol já avaliado apresenta potencial mutagênico para ensaios com bactéria. Este potencial pode variar de acordo com a posição do grupo nitro na molécula. Porém, a localização do grupo nitro, como nos compostos 4-nitroimidazol, pode

inativar o efeito de interesse. Neste caso, há perda do potencial tripanocida (CHAUVIERE et al., 2003).

Figura 4 - Fórmula estrutural do Metronidazol



Fonte: MITAL, 2009.

O possível potencial mutagênico dos metabólitos destes compostos formados em humanos ainda precisa ser estudado para elucidar o efeito do grupo nitroimidazol no DNA humano e seus mecanismos (PUROHIT; BASU, 2000). Com esse conhecimento, buscar desenvolver um derivado ou análogo nitroimidazol com boa resposta farmacológica e sem poder mutagênico, garantindo a segurança de sua utilização no tratamento de doenças (MITAL, 2009).

2.3 Megazol

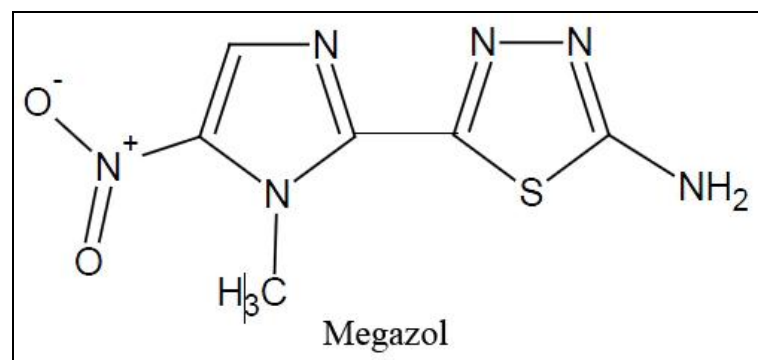
O Megazol [2-amino-5-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)-1,3,4-tiadiazol] (figura 5), sintetizado em 1968 por Berkelhammer e Asato (1968) e caracterizado por Filardi e Brener (1982), é um derivado de 5-nitroimidazol, da classe dos nitro-heterocíclicos, com atividade tripanocida e bactericida (BERKELHAMMER;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

Ratos e frangos infectados com os protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovai*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica* foram tratados com o Megazol, que apresentou alta eficácia de cura para estas infecções (BERKELHAMMER; ASATO, 1968). Winkelmann et al. (1977) também avaliou e

demonstrou 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 BZ (FILARDI; BRENER, 1984, 1987).

Figura 5 - Fórmula estrutural do Megazol



Fonte: NESSLANY et al., 2004.

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.

Comparativamente, o mecanismo de ação do Megazol mostra 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 nucléicos, comum a 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).

Neste cenário, o grupo nitro parece ser o responsável pela atividade contra o protozoário. No entanto, sugere-se que ele seja também responsável pelo poder mutagênico e carcinogênico 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 da *Salmonella*/microsoma (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 detoxificariam substâncias. Efeito citotóxico e danos no DNA foram observados nas células (leucócitos) de rato e camundongo, também.

Nessler 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 se apresentou como uma boa alternativa graças a seu poder tripanocida e maior eficácia quando comparado ao tratamento disponível para a doença de Chagas. No entanto, seu poder mutagênico e genotóxico o impede de ser utilizado como um novo fármaco. 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).

2.4 Análogos do Megazol

2.4.1 Desenvolvimento racional de novas substâncias bioativas

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 que busca eliminar efeitos indesejáveis (efeitos colaterais) de sua ação, além de entender as interações da molécula de interesse com alvos secundários como canais iônicos, enzimas do citocromo P450 e outras proteínas (HUGGINS et al, 2012).

Este modelo de desenvolvimento vem sendo utilizado na síntese de novas moléculas derivadas e análogas do Megazol, buscando eliminar seu efeito citotóxico e genotóxico ao mesmo tempo em que preserva o efeito tripanocida (BOECHAT et al., 2001; CHAUVIÈRE et al., 2003; CARVALHO et al., 2004; CARVALHO et al., 2007a; CARVALHO et al, 2008). 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 e análogos a partir do Megazol com esta finalidade.

Dentre as possíveis estratégias no desenvolvimento racional de novas substâncias derivadas e análogas a partir do Megazol, há a incorporação de um substituinte na posição C4 do anel nitro que diminui o efeito mutagênico de moléculas do grupo 5-nitroimidazol (WALSH et al.,1987).

Outras estratégias modificam a estrutura inicial do Megazol ao substituir anéis hetero-aromáticos, como no desenvolvimento de substâncias contendo o anel triazólico ($C_2H_3N_3$). Estas substâncias apresentam inúmeros efeitos biológicos conhecidos como atividade antifúngica, anticancerígena e anti-HIV (AGALAVE; MAUJAN; PORE, 2011). Além disto, tem sido relatado o efeito tripanocida de algumas substâncias capazes de induzir cura dos sintomas clínicos em ratos na fase aguda e crônica da doença de Chagas, sem apresentar efeitos colaterais (DUSCHAK; COUTO, 2007), além da maior eficácia destes em relação ao Benzonidazol (MOLINA et al., 2000; CERECETTO; GONZÁLEZ, 2002; URBINA et al., 2003).

Da mesma forma, substâncias contendo o anel pirazólico ($C_3H_4N_2$) apresentam efeitos biológicos como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena e antiviral (CHAUHAN; SHARMA; KAUSHIK, 2011), além do relatado efeito tripanocida pela capacidade de inibir a síntese proteica e de RNA do parasita (DUSCHAK; COUTO, 2007).

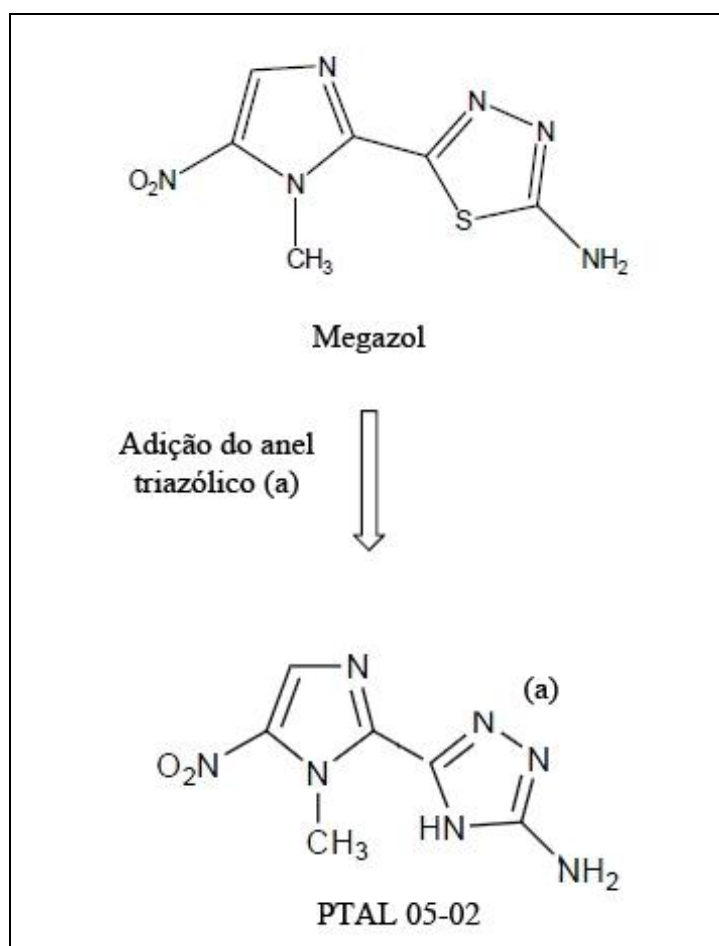
Estas estratégias foram aplicadas no desenvolvimento dos análogos do Megazol com a finalidade de determinar a influência destas modificações na atividade tripanocida e citotóxica em relação ao Megazol.

2.4.2 PTAL 05-02

O análogo PTAL 05-02 (3-amino-5-(1-metil-5-nitro-1H-imidazol-2-il)-1H-1,2,4-triazol) foi desenvolvido pela adição do anel triazólico em substituição ao anel tiadiazólico (figura 6) (CARVALHO et al., 2007b).

Sua atividade tripanocida foi avaliada no tratamento de células de *T. cruzi* na forma tripomastigota pela capacidade de matar 50% das células do parasita, em relação ao Megazol, expressa em IC_{50} por 1 dia. A concentração encontrada que cumpriu com estes parâmetros foi de 552,4 μ M (115 g/mL) (CARVALHO et al., 2007b).

Figura 6 - Resumo da síntese do análogo PTAL 05-02



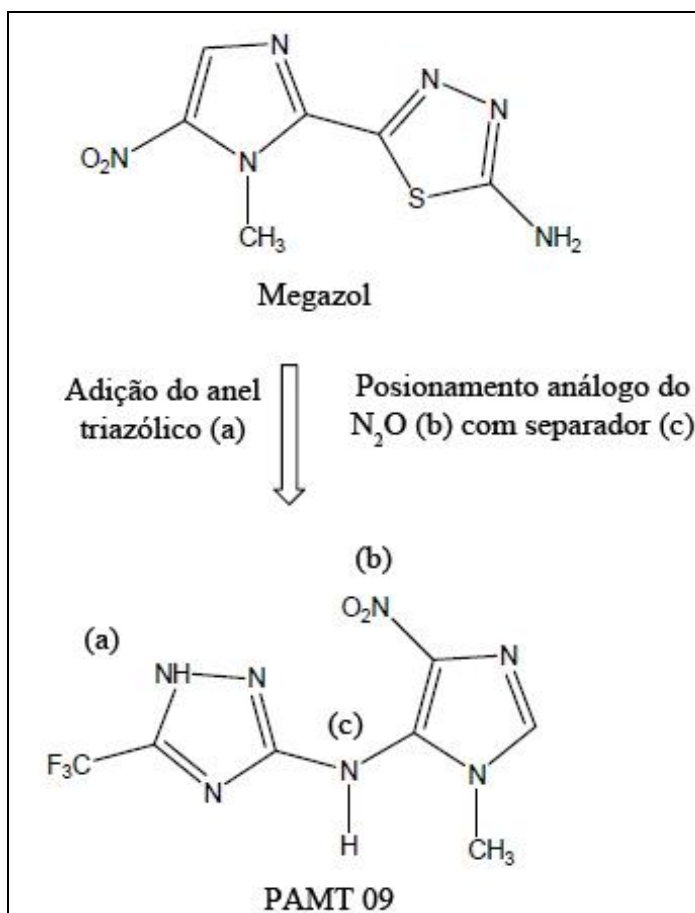
Fonte: CARVALHO et al., 2007b.

2.4.3 PAMT 09

O análogo PAMT 09 (2-amino-N-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-5-(trifluorometil)-1H-1,2,4-triazol) foi desenvolvido pela adição do anel triazólico em substituição ao anel tiadiazólico, pela adição do espaçador e pela mudança de posição do NO₂ do carbono 5 para o carbono 4 (figura 7) (BOECHAT et al., 2001; CARVALHO et al., 2006).

Sua atividade tripanocida foi avaliada pelo tratamento de células de *T. cruzi* na forma tripomastigota, com concentrações variando de 0,003 mg/mL a 2,5 mg/mL. A partir da concentração 0,3 mg/mL (1080 µM), o análogo apresentou 100% de atividade tripanocida (BOECHAT et al., 2001). Em 50% de atividade (IC₅₀), a concentração encontrada foi de aproximadamente 0,066 mg/mL (220 µM).

Figura 7 - Resumo da síntese do análogo PAMT 09

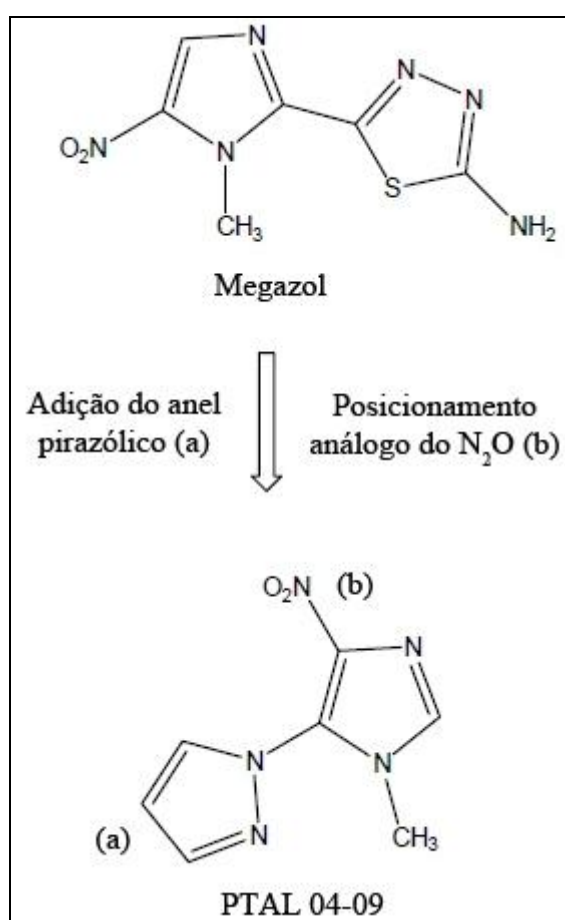


Fonte: CARVALHO et al., 2006.

2.4.4 PTAL 04-09

O análogo PTAL 04-09 (1-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-1H-pirazol) foi desenvolvido pela adição do anel pirazólico em substituição ao anel tiadiazólico e pela mudança de posição do NO₂ do carbono 5 para o carbono 4 (figura 8) (BOECHAT et al., 2001; CARVALHO et al., 2006).

Figura 8 - Resumo da síntese do análogo PTAL 04-09



Fonte : CARVALHO et al., 2006.

Sua atividade tripanocida foi avaliada no tratamento de células de *T. cruzi* na forma tripomastigota com concentrações variando entre 0,003 mg/mL a 2,5 mg/mL. Na concentração 2,5 mg/mL (12900 µM), o análogo apresentou 100% de atividade tripanocida (BOECHAT et al., 2001). Em 50% de atividade (IC₅₀), a concentração encontrada foi de aproximadamente 0,023 mg/mL (120 µM).

3 TESTES GENOTÓXICOS NA AVALIAÇÃO SEGURA DE NOVAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

3.1 Órgãos regulatórios

A OECD é uma organização de alcance mundial que promove políticas de cooperação e desenvolvimento econômico e social nos países membros e não membros. Ela é responsável na reunião de diretrizes para avaliações de substâncias químicas. Essas diretrizes são relacionadas a métodos científicos padronizados que são utilizados em comum acordo com governos, indústrias e laboratórios na identificação e caracterização do possível risco a saúde de novas ou existentes substâncias químicas.

No Brasil, a ANVISA é o órgão regulatório responsável na 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 da OECD.

3.2 Testes genotóxicos na avaliação de novos fármacos

Agentes que alteram o processo de regulação do ciclo celular e induzem mutações, recombinação gênica, quebras nas fitas de DNA ou interações epigenéticas são consideradas carcinógenos e participam no processo de carcinogênese (VARGAS, 1993). Estes agentes lesivos podem levar a uma alteração nos processos de sobrevivência e de proliferação celular (SUHR, 1999). Os danos genéticos podem ser induzidos tanto por agentes naturais como por agentes sintéticos (GESCHER; SHARMA; STEWARD, 2001). Alguns mutágenos necessitam, ainda, de um sistema de metabolização para se tornarem ativos e induzirem as mutações. Para identificar os agentes mutagênicos foram desenvolvidos testes capazes de detectar substâncias com potencial risco à saúde humana (MARON; AMES, 1983).

Os testes genotóxicos, *in vitro* e *in vivo*, são amplamente utilizados para prever o possível efeito carcinogênico de uma substância química em células de mamíferos, mais especificamente quando se objetiva o consumo humano. São metodologias elaboradas para

avaliar os danos no DNA, que contribuem para a carcinogênese, assim como a sua fixação, através de grandes danos cromossômicos ou de recombinação, que possam gerar efeitos hereditários, pelas aneuploidias em células germinativas (OECD, 2009, 2010).

No desenvolvimento de um novo fármaco, os testes toxicológicos são obrigatórios. Uma bateria de testes padrão é necessária para identificar os mecanismos de ação de uma substância química de interesse. O teste da mutação reversa bacteriana (teste da *Salmonella*/microsoma ou teste de Ames) demonstrou que inúmeros compostos que são mutagênicos em bactérias também são carcinogênicos em roedores e humanos. Em conjunto ao teste bacteriano, outras metodologias, *in vitro* e/ou *in vivo*, com células de mamíferos devem ser utilizadas (OECD, 1997, 2009, 2010).

Inúmeros testes *in vitro* utilizando células de mamíferos estão disponíveis. O ensaio da aberração cromossômica na fase metáfase do ciclo celular, o ensaio do micronúcleo e o ensaio da mutação genética em células *Tk* (MLA) são considerados igualmente apropriados na avaliação genotóxica de um novo fármaco. Além destes, testes *in vivo* também são recomendados, uma vez que alguns agentes podem demonstrar potencial mutagênico apenas nestes testes (OECD, 2009, 2010).

Outros testes genotóxicos podem ser utilizados para reforçar a validação das metodologias recomendadas e acrescentar maiores detalhes do mecanismo de ação da substância em teste. A utilização de outras espécies, além das espécies dos roedores, também é recomendada para acrescentar informação. E caso ocorra limite técnico na aplicação de metodologias recomendadas, a substituição destas por outras também é válido (OECD, 1997, 2009, 2010).

Levando-se em consideração a relevância dos testes disponíveis, a OECD oferece dois conjuntos de metodologias que podem ser utilizados na avaliação genotóxica de um novo fármaco. A primeira opção indica a utilização de um teste para avaliar a mutagenicidade em bactéria (teste da mutação reversa bacteriana, por exemplo), um teste citogenético *in vitro* na avaliação de dano cromossômico (teste do micronúcleo, por exemplo), e outro teste *in vivo* na avaliação de dano cromossômico utilizando células hematopoéticas de roedores. A segunda opção indica um teste para avaliar mutagenicidade em bactéria e um teste *in vivo* utilizando células de dois tecidos diferentes, geralmente células hematopoéticas e hepatócitos de roedores (OECD, 1997, 2009, 2010).

A análise e interpretação dos resultados obtidos nos testes vão determinar o risco presente na utilização de novos fármacos de interesse em seres humanos. Quando este efeito está ausente, demonstrado por dois testes *in vivo*, pode-se considerar que não há risco

genotóxico do agente avaliado, mesmo que um resultado positivo tenha sido encontrado em testes *in vitro*, já que esta resposta positiva não traduz totalmente um risco à saúde em humanos (OECD, 2009, 2010).

Certos mecanismos indiretos de genotoxicidade de certas classes de drogas, que se manifestam apenas acima de determinadas concentrações, podem decidir as condições necessárias para utilização de um novo fármaco. Quando há resultado positivo em testes *in vitro*, os *in vivo* podem demonstrar a significância biológica destes sinais para estabelecer níveis seguros de utilização da substância em avaliação (OECD, 2009, 2010).

3.3 Indução de mutação reversa bacteriana (teste da *Salmonella*/microsoma ou teste de Ames)

A identificação e avaliação segura de novos compostos químicos com a possibilidade de induzir mutações se tornou um importante procedimento, principalmente por envolver substâncias que podem ser de interesse ao uso humano. A utilização de testes de longo prazo, em animais, na avaliação da carcinogenicidade de substâncias é mais confiável por apresentar uma correlação maior do possível mecanismo de ação em seres humanos (PURCHASE, 1991).

Testes bacterianos de avaliação mutagênica e genotóxica, de curto prazo, têm desempenhado um importante papel nesta identificação, seja pela sua simplicidade, rapidez e baixo custo quanto pela reconhecida capacidade de detectar um amplo leque de componentes mutagênicos (MARON; AMES, 1983; MORTHELMANS; ZEIGER, 2000). Além disto, há uma grande associação entre um agente ser mutagênico e genotóxico para bactéria e carcinogênico para mamíferos (MOHN, 1981; PURCHASE, 1982).

As mutações pontuais são causas para muitas doenças genéticas em humanos e estão envolvidas na formação tumoral quando ocorrem em oncogenes e genes de supressão tumoral. O teste da mutação reversa bacteriana, com capacidade para detectar este tipo de mutação, utiliza procaríotos, que diferem das células eucariotas de mamíferos em fatores como metabolismo, estrutura cromossômica e sistema de reparo do DNA. Outro fator importante é a necessidade dos testes *in vitro* em utilizar uma fonte de metabolização exógena para mimetizar ao máximo o ambiente metabólico *in vivo* das células de mamíferos (OECD, 1997).

Esta metodologia utiliza linhagens da bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium deficientes na síntese do aminoácido histidina, necessário para a sobrevivência 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, há a disponibilidade de inúmeras linhagens que em contato com uma substância mutagênica, é capaz de evidenciar seu mecanismo de ação. Além disto, outras mutações (permeabilidade da parede citoplasmática, deficiência no sistema de reparo *uvrB*) na bactéria e outras características (presença de plasmídeo) aumentam a sensibilidade do sistema na detecção de compostos mutagênicos (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 tipos de substâncias químicas quanto à mutagenicidade e seus mecanismos de ação. A linhagem TA1535 pode ser utilizada pela sua capacidade de detectar determinados mutágenos que a TA100 não detecta (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

No entanto, a mutagenicidade de nitro compostos pode não ser evidenciada pelas linhagens padrão ou ocorrerem de forma fraca já que estas expressam baixos níveis de enzimas nitroredutase em relação à linhagem de *S. enterica* de origem (LT2), devido à deleção de um importante gene responsável pela síntese destas enzimas (MARON; AMES, 1983; WATANABE et al., 1989; WATANABE et al., 1990; PORWOLLIL et al., 2001).

Por isto, é interesse aproveitar, caso exista, o conhecimento prévio sobre o agente teste como a classe da substância, o possível mecanismo de ação, entre outros fatores, que podem determinar as condições do experimento, principalmente na utilização de linhagens alternativas às recomendadas para uso inicial (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

A utilização de linhagens nitroredutases deficientes (TA98NR, TA100NR, TA1535NR) e supercompetente (YG1021) e, acetiltransferase deficiente (TA98/1,8-DNP₆) e supercompetente (YG1024), são importantes na análise da atividade metabólica de nitro compostos. Acredita-se que estas enzimas estejam envolvidas na ativação do efeito mutagênico de amins aromáticas, de compostos nitro aromáticos, de aril hidroxilaminas (WATANABE et al., 1989; WATANABE et al., 1990; JOSEPHY et al., 1994) e possivelmente dos derivados e análogos do Megazol.

Os testes bacterianos, principalmente o teste de Ames, são reconhecidos na comunidade científica e institutos internacionais de regulamentação, e utilizados na avaliação inicial para determinar a mutagenicidade de agentes químicos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Porém, a genotoxicidade também deve ser avaliada em células de mamífero por metodologia *in vitro* e/ou *in vivo*.

3.4 Teste *in vitro* do micronúcleo com células de mamíferos

O teste do micronúcleo é um ensaio para a avaliação genotóxica (atividade aneugênica e clastogênica) de substâncias que são responsáveis pela formação de micronúcleos no citoplasma das células em interfase. É um ensaio robusto e eficaz em diversas linhagens celulares de roedores (hepatócitos, medula óssea) e linfócitos do sangue periférico de humanos (OECD, 2010).

O micronúcleo representa dano ao DNA que foi transmitido às células filhas. Ele se origina de fragmentos de cromossomos acêntricos ou de todo cromossomo que foi incapaz de migrar para os polos no estágio anáfase da divisão celular. Na análise da indução de micronúcleo, é importante que as células tratadas e não tratadas completem uma divisão celular (OECD, 2010).

Além de sua modalidade *in vitro*, também é possível analisar a ocorrência de micronúcleos em modelos experimentais *in vivo* através do tratamento de animais. Roedores (ratos, camundongos) são os mais utilizados e recomendados, na análise de eritrócitos policromáticos micronucleados no sangue periférico ou da medula óssea (OECD, 2010, 2011).

Pela qualidade da metodologia na análise genotóxica de substâncias, a utilização deste ensaio é recomendada pela OECD (2010) na avaliação inicial de compostos de interesse.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar a capacidade mutagênica, citotóxica e genotóxica dos análogos do Megazol, de acordo com as orientações da OMS e OECD.

4.2 Específicos

- a) Avaliar a capacidade mutagênica e citotóxica dos análogos de Megazol através do Teste da mutação reversa bacteriana (*Salmonella*/microsoma) em cepas padrão (TA97, TA98, TA100, TA102) e TA1535 de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, na presença e ausência de ativação metabólica exógena;
- b) Avaliar a capacidade mutagênica e citotóxica dos análogos de Megazol através do teste da mutação reversa bacteriana (*Salmonella*/microsoma) em cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, deficientes (TA100NR, TA98NR, TA1535NR) e supercompetente (YG1021) na síntese de nitroreduases, na presença e ausência de ativação metabólica exógena;
- c) Avaliar a capacidade mutagênica e citotóxica dos análogos de Megazol através do teste da mutação reversa bacteriana (*Salmonella*/microsoma) em cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, deficiente (TA98/1,8-DNP₆) e supercompetente (YG1024) na síntese de nitroreduases e acetiltransferases na presença e ausência de ativação metabólica exógena;
- d) Avaliar a capacidade dos análogos de induzir genotoxicidade através da formação de micronúcleos e análise de viabilidade celular em células macrófago RAW264,7 de rato.

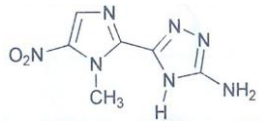
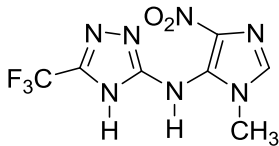
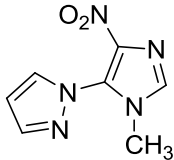
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Preparo e diluição dos análogos do Megazol

Os análogos do Megazol foram sintetizados e fornecidos pelo grupo da Dr. Núbia Boechat, do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) na Fundação Oswaldo Cruz, no Departamento de Síntese Orgânica, e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO).

São eles: PAMT 09 (2-amino-N-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-5-(trifluorometil)-1H-1,2,4-triazol), PTAL05-02 (3-amino-5-(1-metil-5-nitro-1H-imidazol-2-il)-1H-1,2,4-triazol) e PTAL 04-09 (1-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-1H-pirazol). As informações sobre fórmula, peso e estrutura molecular dos análogos estão reunidas no quadro 1.

Quadro 1 - Fórmulas estruturais, fórmulas condensadas e pesos moleculares dos análogos do Megazol

Análogo	Fórmula estrutural	Fórmula condensada	Peso molecular
PTAL 05-02		$C_6H_7N_7O_2$	209
PAMT 09		$C_7H_7F_3N_7O_2$	278
PTAL 04-09		$C_7H_7N_5O_2$	193

Fonte: adaptado de BOECHAT et al., 2001; CARVALHO et al., 2006; CARVALHO et al, 2007b.

5.2 Presença de metabolização exógena

A solução de metabolização exógena (S9 mix) tem a finalidade de tornar os testes em organismos procariotos mais consistentes e aplicáveis, uma vez que a fração S9 mix mimetiza o sistema de metabolização de xenobióticos presente em mamíferos.

A fração S9 mix utilizada foi adquirida do laboratório Molecular Toxicology Inc. (MolttoxTM, USA) e preparada a partir de fígados de ratos machos Sprague-Dawley pré-induzidos por bifenil-policlorinato (Aroclor 1254). O Aroclor 1254 induz principalmente a síntese de CYP2B e CYP1A, podendo levar tanto ao aumento da desintoxicação quanto ao aumento da ativação dos xenobióticos, o que dependerá da substância estudada (ZEIGER et al., 1979).

A preparação da solução de S9 mix (4%) foi realizada de acordo com Mortelmans e Zeiger (2000) em condições de esterilidade total e em banho de gelo. Para 50 mL de S9 mix utilizou-se 5,0 mL de S9 reconstituído com 2,1 mL de água 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; 16,75 mL de água destilada estéril.

5.3 Teste da mutação reversa bacteriana (*Salmonella*/microsoma)

5.3.1 Linhas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium

O teste de mutação reversa utiliza cepas bacterianas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium deficientes na produção do aminoácido histidina (*His*), derivadas da linhagem LT1 de *S. enterica*, e tem por finalidade detectar a atividade mutagênica induzida por compostos através da reversão do fenótipo *His*⁻ para *His*⁺, mensurado através do crescimento de colônias revertentes em meio de cultura mínimo na ausência de histidina.

Cada cepa apresenta uma mutação específica no *operon* histidina. A linhagem TA97 possuiu mutação no *loci* *hisD6610* e *hisO1242*, detectando 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. A cepa TA98, TA98NR, TA98/1,8-DNP₆, YG1021 e

YG1024 possuem mutação no *locus hisD3052* detectando mutações do tipo *frameshift* por adição de par de bases. Além disto, a TA98NR e TA98/1,8-DNP₆ são deficientes e supercompetentes na síntese de enzimas nitroreduases, respectivamente. A linhagem TA100, TA100NR, TA1535 e TA1535NR possuem mutação no *locus hisG46* detectando mutações por substituição de par de bases que resultam na substituição de uma sequência de síntese de prolina (GGG/CCC) por uma de leucina (GAG/CTC). As TA100NR e TA1535NR são deficientes na síntese de enzimas nitroreduases. A cepa TA102 possui mutação no *locus hisG428*, que se encontra em seu plasmídeo, ao contrário das outras cepas onde se localizam no cromossomo, detectando mutações por substituição de par de bases através de danos oxidativos (MARON; AMES, 1983; WATANABE et al., 1989; WATANABE et al., 1990; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Outras mutações foram agregadas às cepas para conferir maior sensibilidade na detecção da possível mutagenicidade dos agentes testes. A mutação *rfa* confere perda parcial da barreira de polissacarídeo da membrana celular aumentando a permeabilidade a grandes moléculas. A mutação *uvrB* é uma deleção do gene que codifica o sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (REN) resultando em um aumento da sensibilidade na detecção de diversos mutágenos. A cepa TA102 não apresenta tal mutação, pois seu objetivo é detectar mutágenos que exigem este sistema de reparo. Por razões técnicas, essa mutação se estende ao gene que codifica a biotina, sendo necessário seu acréscimo nos ensaios.

As linhagens TA97, TA98, TA98NR, TA98/1,8-DNP₆, TA100, TA100NR e TA102 apresentam o plasmídeo pKM101 (R⁺) que confere resistência ao antibiótico ampicilina e aumenta a sensibilidade do sistema na detecção de substâncias mutagênicas, através do aumento da via de reparo de DNA propenso a erros (*error-prone*) (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). A linhagem TA102 ainda apresenta o plasmídeo pAQ1 que confere resistência ao antibiótico tetraciclina e aumenta os sítios alvos de substâncias mutagênicas. A linhagem YG1021 apresentam o plasmídeo pYG216, enquanto a linhagem YG1024, o plasmídeo pYG219, que são responsáveis pela capacidade de exacerbada de síntese de enzimas nitroreduases e acetiltransferases, respectivamente (WATANABE et al., 1989; WATANABE et al., 1990). As linhagens TA1535 e TA1535NR não apresentam plasmídeo (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

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

Quadro 2 - Relação das linhagens de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium derivadas de LT1 utilizadas nos testes quantitativo e qualitativo de mutagenicidade e toxicidade e suas respectivas características genotípicas (continua)

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.
TA98/1,8-DNP ₆	CGCGCGCG	<i>hisD3052</i>	Alteração no quadro de leitura, por adição de pares de base G-C; Deficiente na síntese de acetiltransferases.
TA98NR	CGCGCGCG	<i>hisD3052</i>	Alteração no quadro de leitura, por adição de pares de base G-C; Deficiente na síntese de nitroreduases.
YG1021	CGCGCGCG	<i>hisD3052</i>	Substituição de pares de base de G-C para T-A; Supercompetente na síntese de nitroreduases.
YG1024	CGCGCGCG	<i>hisD3052</i>	Alteração no quadro de leitura, por adição de pares de base G-C; Supercompetente na síntese de acetiltransferases.
TA100	GGG	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de base de G-C para T-A.
TA100NR	GGG	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de base de G-C para T-A; Deficiente na síntese de nitroreduases.
TA1535	GGG	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de base de G-C para T-A.
TA1535NR	GGG	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de base de G-C para T-A; Deficiente na síntese de nitroreduases.

Quadro 2 - Relação das linhagens de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium derivadas de LT1 utilizadas nos testes quantitativo e qualitativo de mutagenicidade e toxicidade e suas respectivas características genotípicas (conclusão)

TA102	TAA	hisG428	Transições/transversões; Substituição de pares de base T-A para G-C.
-------	-----	---------	--

Fonte: Adaptado de MARON; AMES, 1983; WATANABE et al., 1989; WATANABE et al., 1990; MORTELMANS; ZEIGER, 2000.

5.3.2 Controle negativo e positivo

O controle negativo utilizado neste ensaio foi o DMSO e os controles positivos utilizados, na ausência e presença de S9 mix, respectivamente, foram: 4-nitroquinolina-1-oxido (4NQO), CAS# 7608-65-0, pureza $\geq 97\%$, e 2-amino-antraceno (2AA), CAS# 613-13-8, pureza $\geq 96\%$, para TA97, TA98, TA98NR, TA98/1,8-DNP₆, YG1021 e YG1024; Azida sódica (AS), CAS# 26628-22-8, pureza $\geq 99,5\%$, e 2AA para TA100, TA100NR, TA1535 e TA1535NR; Mitomicina-C (MitC), CAS# 50-07-7, pureza $\geq 99\%$, para TA102.

Todas as substâncias mutagênicas foram fornecidas pela Sigma Co.

5.3.3 Teste quantitativo de mutagenicidade e citotoxicidade (com pré-incubação)

A mutagenicidade e a citotoxicidade foram determinadas segundo Mortelmans e Zeiger (2000), utilizando-se as linhagens de *S. enterica* descritas no quadro 2. As cepas cresceram por 16 horas em meio Luria Bertani alcançando-se a fase estacionária contendo $1-2,0 \times 10^9$ células/mL. Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 mL de cultura bacteriana, 500 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 (para o ensaio sem ativação metabólica) ou 500 mL de S9 mix (para o ensaio com ativação metabólica), e 100 mL da droga teste, assim como o controle negativo e controle positivo, descritos anteriormente no capítulo 5.3.2, em substituição ao agente teste. Em seguida, foram incubados por 20 minutos, a 37°C com agitação constante (131 OPM).

Para o teste de citotoxicidade, 10 mL da pré-incubação anteriormente citada foram diluídas em NaCl 0.9% para a obtenção de uma suspensão contendo $2,0 \times 10^3$ células/mL. Desta, uma alíquota de 100 μ L foi plaqueada em meio Luria Bertani sólido. As placas foram

incubadas a 37°C, por 24 horas e as colônias contadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A citotoxicidade foi considerada positiva quando $p < 0,05$ na análise de variância (*one-way* ANOVA) e quando a sobrevivência celular foi menor que 70% em relação ao controle negativo (AIUB et al., 2004).

Para o teste de mutagenicidade, foram adicionados 2,0 mL de top ágar em cada tubo e esta solução vertida em placas de petri contendo meio mínimo. Em seguida, foram incubadas em estufa a 37°C, por 72 horas. Após, as colônias revertentes *His*⁺ foram contadas e o índice de mutagenicidade (I.M.) determinado pela razão do número de revertentes da amostra pelo número de revertentes do controle negativo.

O resultado foi considerado positivo (substância considerada como mutagênica), quando o I.M. foi igual ou superior a dois e quando $p < 0,05$ na análise de variância (*one-way* ANOVA), além da presença de uma curva dose-resposta, para uma ou mais linhagem de *S. enterica*. No entanto, há casos em que substâncias mutagênicas não apresentam relação dose resposta (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Para a análise quantitativa de mutagenicidade e citotoxicidade, foram utilizadas as seguintes linhagens: TA97, TA98, TA98NR, TA98/1,8-DNP₆, YG1021, YG1024, TA100, TA100NR, TA1535, TA1535NR e TA102. As concentrações iniciais utilizadas de cada análogo do Megazol estão descritas no quadro 3. Os experimentos foram realizados em triplicata para a confirmação dos resultados.

Quadro 3 - Equivalência entre a concentração inicial, massa final e massa molar utilizada pelos análogos do Megazol no teste quantitativo de mutagenicidade e citotoxicidade

Análogos	Concentração Inicial (µg/mL)	Massa final (µg/placa)	Massa molar (µM)
PTAL 05-02	0,05	0,005	0,24
	0,1	0,01	0,48
	0,5	0,05	2,40
	1,0	0,1	4,8
PAMT 09	0,05	0,005	0,18
	0,1	0,01	0,36
	0,5	0,05	1,8
	1,0	0,1	3,6
PTAL 04-09	1,0	0,1	5,2
	5,0	0,5	26
	10	1,0	52
	50	5,0	260

Fonte: O autor, 2012.

5.4 Teste *in vitro* do micronúcleo com macrófago RAW 264.7

O teste genotóxico do micronúcleo seguiu as diretrizes determinadas pela OECD (2010), utilizando-se macrófagos de camundongos BALB/c transformadas pelo retrovírus da leucemia em camundongo Abelson (A-MuLV).

A linhagem celular RAW 264,7 cresceu em frasco para meio de cultura de volume 150 mL, com 100 mL de meio de cultura EAGLE (11,875 g Meio Mínimo Essencial EAGLE; 2,2 g NaHCO₃; 1,1 g piruvato; 27 mg ácido aspártico; 21 mg L-serina) com 10% de soro fetal bovino, por 72 horas em estufa de CO₂ 5% à 37°C.

Após o crescimento, as células aderidas na base do frasco foram removidas de sua adesão com espátula (scraper) e, junto com o meio de cultura EAGLE, centrifugadas por 5 minutos à 5000 RPM. O meio de cultura EAGLE (sobrenadante) foi removido e o conteúdo celular (*pellet*) dissolvido em 4 mL de meio de cultura EAGLE com 10% de soro fetal bovino, concentração final de $1,05 \times 10^6$ células/mL.

Em placa de cultura celular de 24 poços contendo lâminas circulares de 13 cm, foi adicionado por poço 950 μL de meio de cultura EAGLE com 10% de soro fetal bovino e 50 μL da solução com a linhagem celular RAW 264,7, previamente centrifugada e diluída em meio. A placa de cultura permaneceu na estufa de CO_2 5%, 37°C, por 24 horas.

Para o tratamento celular, foram adicionados 100 μL do agente teste, controle negativo ou controle positivo, em seus respectivos poços. Em seguida, a placa de cultura celular permaneceu por 3 horas em estufa de CO_2 5% à 37°C. Após o tempo necessário de tratamento, iniciou-se a lavagem dos poços, adicionando-se e removendo-se 1,0 mL de meio de cultura EAGLE sem 10% de soro fetal bovino. Novamente foi adicionado meio de cultura EAGLE com 10% de soro fetal bovino. Por fim, a placa de cultura permaneceu na estufa de CO_2 5%, 37°C, por 24 horas.

Na etapa de fixação, foi retirado todo o meio de cultura EAGLE presente nos poços e adicionado 1,0 mL de fixador (três partes de metanol 100% por uma de ácido acético glacial 100%), mantido por 15 minutos. Em seguida, retirou-se o fixador dos poços e se adicionou e retirou 1,0 mL de tampão McIlvaine (solução de 21,01 g de ácido crítico, 0,1 M; solução de 35,60 g de Na_2HPO_4 , 0,2 M;) pH 7,5.

Na coloração, em ambiente escuro, foi adicionado por poço 500 μL de solução de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido; 100 mL de tampão McIlvaine; 1,0 mL de solução de DAPI 300 mM) e mantida por 40 minutos. Em seguida, lavou-se por duas vezes cada poço com 1,0 mL de tampão McIlvaine. As soluções utilizadas na lavagem foram descartadas em lixo especial apropriado.

Por fim, as lamínulas circulares com as células aderidas foram removidas de cada poço e analisadas quanto ao aparecimento de células micronucleadas, em apoptose, necrose ou divisão mitótica, a cada 1000 células, em microscópio de fluorescência com luz azul de comprimento de onda 430 nm.

O experimento foi realizado com cinco réplicas por concentração. O controle positivo utilizado foi o MNNG (1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina) a 0,5 μM . O controle negativo foi o DMSO. E as concentrações utilizadas são 10, 100 e 1000 vezes maiores em relação à primeira concentração tóxica utilizada nos ensaios bacteriológicos, de acordo com a diretriz de concentrações recomendadas para estudos genotóxicos em modelos animais (LEVY; WEGMAN, 2000), e estão presentes no quadro 4.

O resultado foi considerado positivo quando a formação de micronúcleos for 50% maior em relação ao controle negativo, e quando $p < 0,05$.

Quadro 4 - Equivalência entre a concentração inicial, massa final e massa molar utilizada pelos análogos do Megazol no teste do micronúcleo

Análogos	Concentração Inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Massa final ($\mu\text{g/poço}$)	Massa molar (μM)
PTAL 05-02	1,0	0,1	4,8
	10	1,0	48
	100	10	480
PAMT 09	1,0	0,1	3,6
	10	1,0	36
	100	10	360
PTAL 04-09	1,0	0,1	5,2
	10	1,0	52
	100	10	520

Fonte: O autor, 2012

6 RESULTADOS

6.1 PTAL 05-02

6.1.1 Teste quantitativo de mutagenicidade e citotoxicidade

No teste quantitativo de mutagenicidade, utilizando-se as linhagens padrão (tabela 1), na presença e na ausência de metabolização exógena S9 mix, o análogo PTAL 05-02 não apresentou potencial mutagênico ($I.M. \geq 2$) para nenhuma das linhagens e concentrações utilizadas.

No teste quantitativo de citotoxicidade, utilizando-se as linhagens padrão (tabela 1), houve resposta citotóxica para a linhagem TA100, na presença de S9 mix, sugerindo que esse sistema metabólico é responsável pela geração de intermediários tóxicos para esta linhagem.

Tabela 1 - Teste de mutagenicidade com cepas de *S. enterica* TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 05-02

PTAL 05-02	μg/mL	-S9			+S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA97	0	87 ± 9,8	1,00	100	97 ± 25	1,00	100
	0,05	89 ± 5,0	1,03	90	67 ± 3,5	0,70	100
	0,1	89 ± 12	1,03	100	68 ± 4,0	0,70	92
	0,5	86 ± 8,5	0,99	100	74 ± 0,0	0,76	90
	1,0	83 ± 1,7	0,95	100	69 ± 4,5	0,71	80
	CP	625 ± 66	7,19*	71	929 ± 195	9,55*	99
TA98	0	45 ± 1,5	1,00	100	18 ± 6,4	1,00	100
	0,05	30 ± 2,1	0,67	100	18 ± 5,5	0,96	95
	0,1	38 ± 5,0	0,83	98	21 ± 2,0	1,16	90
	0,5	38 ± 11	0,84	100	19 ± 1,7	1,02	81
	1,0	58 ± 11	1,28	94	22 ± 5,2	1,18	91
	CP	501 ± 105	10*	81	36 ± 11	3,95	94
TA100	0	120 ± 23	1,00	100	117 ± 19	1,00	100
	0,05	136 ± 15	1,13	100	121 ± 25	1,04	79
	0,1	102 ± 25	0,85	90	106 ± 12	0,91	62
	0,5	84 ± 10	0,70	100	128 ± 18	1,09	64
	1,0	105 ± 9,8	0,88	100	129 ± 13	1,10	49
	CP	1556 ± 309	13*	100	246 ± 64	2,10*	89
TA102	0	254 ± 16	1,00	100	265 ± 12	1,00	100
	0,05	254 ± 31	1,00	79	253 ± 19	0,95	100
	0,1	276 ± 14	1,09	84	225 ± 4,0	0,85	100
	0,5	253 ± 11	1,00	79	238 ± 16	0,90	100
	1,0	261 ± 14	1,03	78	256 ± 8,3	0,97	100
	CP	2360 ± 312	9,28*	77	1817 ± 223	6,86*	100

Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; *Diferença significativa ($p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Fonte: O autor, 2012.

No teste quantitativo de mutagenicidade, utilizando-se as linhagens derivadas de TA98 (tabela 2), na presença e na ausência de metabolização exógena S9 mix, o análogo PTAL 05-02 não apresentou potencial mutagênico (I.M. ≥ 2) para as linhagens TA98NR, YG1021 e YG1024. Na ausência de metabolização exógena, o análogo PTAL 05-02 foi mutagênico para linhagem TA98/1,8-DNP₆, em todas as concentrações utilizadas ($p < 0,05$). Este efeito pode estar relacionado à provável ligação direta do mutágeno ao DNA gerando resposta mutagênica positiva. O mesmo efeito não foi observado na presença de S9 mix, sugerindo-se que ocorreu geração de metabolitos intermediários sem potencial mutagênico.

No teste quantitativo de citotoxicidade, utilizando-se as linhagens derivadas de TA98 (tabela 2), houve efeito citotóxico do análogo PTAL 05-02, independente de metabolização exógena, na linhagem YG1024, supercompetente na expressão de acetiltransferases. Há

também efeito citotóxico para a linhagem YG1021, mas apenas na presença de S9 mix e nas duas maiores concentrações utilizadas. Este efeito citotóxico pode estar relacionado à presença das enzimas nitroredutase e acetiltransferase que estariam metabolizando este análogo em intermediários tóxicos. Além disto, este efeito pode estar mascarando um possível efeito mutagênico.

Tabela 2 - Teste de mutagenicidade com cepas de *S. enterica* TA98 e suas derivadas TA98NR, YG1021, TA98/1,8-DNP₆ e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 05-02

PTAL 05-02	μg/mL	-S9			+S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA98	0	45 ± 1,5	1,00	100	18 ± 6,4	1,00	100
	0,05	30 ± 2,1	0,67	100	18 ± 5,5	0,96	95
	0,1	38 ± 5,0	0,83	98	21 ± 2,0	1,16	90
	0,5	38 ± 11	0,84	100	19 ± 1,7	1,02	81
	1,0	58 ± 11	1,28	94	22 ± 5,2	1,18	91
	CP	501 ± 105	10*	81	36 ± 11	3,95	94
TA98NR	0	17 ± 2,0	1,00	100	23 ± 3,7	1,00	100
	0,05	20 ± 4,1	1,17	84	16 ± 0,7	0,70	70
	0,1	22 ± 6,5	1,25	91	18 ± 4,0	0,76	70
	0,5	22 ± 0,7	1,27	86	16 ± 3,5	0,76	70
	1,0	23 ± 2,0	1,32	82	11 ± 2,0	0,49	77
	CP	36 ± 1,4	2,04*	10	928 ± 28	39*	40
YG1021	0	17 ± 3,2	1,00	100	19 ± 3,0	1,00	100
	0,05	15 ± 4,1	0,90	83	13 ± 0,0	0,66	79
	0,1	14 ± 4,3	0,81	100	13 ± 2,8	0,66	70
	0,5	15 ± 7,0	0,88	99	13 ± 2,5	0,69	49
	1,0	13 ± 3,8	0,79	100	14 ± 4,3	0,71	52
	CP	117 ± 27	6,79*	83	992 ± 220	50*	48
TA98/1,8-DNP ₆	0	110 ± 24	1,00	100	60 ± 6,6	1,00	100
	0,05	264 ± 19	2,39*	100	60 ± 8,3	1,01	100
	0,1	233 ± 5,2	2,11*	100	57 ± 5,5	0,96	100
	0,5	242 ± 20	2,19*	100	56 ± 5,0	0,94	99
	1,0	252 ± 5,1	2,28*	70	64 ± 7,5	1,07	91
	CP	710 ± 111	6,42*	100	59 ± 5,0	2,80*	97
YG1024	0	12 ± 2,5	1,00	100	165 ± 6,6	1,00	100
	0,05	12 ± 4,9	1,01	12	123 ± 4,0	0,74	25
	0,1	12 ± 3,0	1,00	26	122 ± 2,6	0,74	29
	0,5	15 ± 2,8	1,22	31	133 ± 5,5	0,80	30
	1,0	16 ± 1,4	1,30	28	100 ± 14	0,61	36
	CP	251 ± 13	20*	34	1158 ± 347	6,99*	39

Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; *Diferença significativa ($p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Fonte: O autor, 2012.

No teste quantitativo de mutagenicidade, utilizando-se as linhagens derivadas da TA100 e TA1535 (tabela 3), na presença e na ausência de metabolização exógena S9 mix, o análogo PTAL 05-02 não apresentou potencial mutagênico (I.M. ≥ 2) para nenhuma das linhagens e concentrações utilizadas.

No teste quantitativo de citotoxicidade (tabela 3), houve resposta citotóxica nas linhagens TA100 e TA1535, apenas na presença de S9 mix. Nas linhagens deficientes na síntese de nitroredutases, não houve efeito citotóxico, independente de S9 mix. Esta resposta pode sugerir o envolvimento conjunto de nitroredutases e das enzimas do citocromo P450 (S9 mix) na indução do efeito tóxico deste análogo PTAL 05-02 ou de seus metabólitos, além de poder estar mascarando um possível efeito mutagênico.

Tabela 3 - Teste de mutagenicidade com cepas de *S. enterica* TA100 e suas derivadas TA100NR, TA1535 e TA1535NR, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 05-02

PTAL 05-02	$\mu\text{g/mL}$	-S9			+S9		
		Média \pm DP	I.M.	% Sobr.	Média \pm DP	I.M.	% Sobr.
TA100	0	120 \pm 23	1,00	100	117 \pm 19	1,00	100
	0,05	136 \pm 15	1,13	100	121 \pm 25	1,04	79
	0,1	102 \pm 25	0,85	90	106 \pm 12	0,91	62
	0,5	84 \pm 10	0,70	100	128 \pm 18	1,09	64
	1,0	105 \pm 9,8	0,88	100	129 \pm 13	1,10	49
	CP	1556 \pm 309	13*	100	246 \pm 64	2,10*	89
TA100NR	0	109 \pm 10	1,00	100	13 \pm 2,0	1,00	100
	0,05	100 \pm 7,0	0,91	100	5,6 \pm 3,0	0,41	100
	0,1	97 \pm 10	0,89	100	5,0 \pm 2,0	0,37	100
	0,5	77 \pm 1,5	0,71	100	4,0 \pm 1,0	0,29	100
	1,0	81 \pm 3,0	0,74	93	3,0 \pm 2,6	0,22	74
	CP	377 \pm 24	3,44*	94	277 \pm 46	20*	86
TA1535	0	22 \pm 3,2	1,00	100	5,3 \pm 1,5	1,00	100
	0,05	21 \pm 3,2	0,94	100	5,3 \pm 0,5	1,00	47
	0,1	23 \pm 2,0	1,03	100	5,3 \pm 0,5	1,00	42
	0,5	22 \pm 4,0	1,00	97	6,6 \pm 1,5	1,25	40
	1,0	26 \pm 2,0	1,15	93	6,3 \pm 2,0	1,19	44
	CP	75 \pm 12	3,31*	1,0	33 \pm 7,2	6,25*	15
TA1535NR	0	9,0 \pm 1,7	1,00	100	20 \pm 2,0	1,00	100
	0,05	9,5 \pm 0,7	1,06	100	19 \pm 4,2	0,95	76
	0,1	9,5 \pm 6,3	1,06	100	22 \pm 3,0	1,12	75
	0,5	13 \pm 2,5	1,48	100	20 \pm 6,5	1,00	83
	1,0	11 \pm 5,7	1,30	100	22 \pm 6,3	1,13	79
	CP	533 \pm 68	59*	100	42 \pm 7,0	2,10*	56

Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; *Diferença significativa ($p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Fonte: O autor, 2012.

6.1.2 Teste *in vitro* do micronúcleo com macrófago RAW 264,7

A genotoxicidade do análogo PTAL 05-02 foi avaliada na utilização do teste do micronúcleo com macrófago RAW 264,7 (tabela 4).

O análogo PTAL 05-02 induziu a formação de micronúcleos significativamente, em todas as concentrações utilizadas. Na maior concentração utilizada, observou-se diminuição de células em divisão ($p < 0,05$) e um aumento de células em apoptose ($p < 0,05$), indicando efeito citotóxico dose-dependente.

Tabela 4 - Teste do micronúcleo com macrófagos RAW 264,7 utilizando o análogo do Megazol PTAL 05-02

Análogo	$\mu\text{g/mL}$	% I.Mi. \pm DP	% Apop.	% Necr.	% Sobr.	% Micronúcleo \pm DP
0	DMSO	$6,0 \pm 4,2$	0,06	0,12	99,8	$0,7 \pm 0,4$
	1,0	$0,8 \pm 0,0^*$	5,90*	0,16	93,9*	$3,5 \pm 1,2^*$
PTAL 05-02	10	$3,0 \pm 2,2$	7,14*	0,02	92,9*	$9,8 \pm 6,4^*$
	100	$1,2 \pm 0,8^*$	11,4*	0,06	88,5*	$6,6 \pm 2,9^*$
CP	MNNG	$5,2 \pm 3,7$	0,30	0,00	99,7*	$2,8 \pm 1,4^*$

Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de quintuplicatas; 0: controle negativo; CP: controle positivo; I.Mi.: índice mitótico; Apop.: apoptose; Necr.: necrose; Sobr.: sobrevivência; DP: desvio padrão; *Diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: O autor, 2012.

6.2 PAMT 09

6.2.1 Teste quantitativo de mutagenicidade e citotoxicidade

No teste quantitativo de mutagenicidade, utilizando-se as linhagens padrão recomendadas (tabela 5), na presença e na ausência de metabolização exógena S9 mix, o

análogo PAMT 09 não apresentou potencial mutagênico (I.M. ≥ 2) para nenhuma das linhagens padrão.

No teste quantitativo de citotoxicidade, utilizando-se as linhagens padrões recomendadas (tabela 5), o análogo PAMT 09 foi citotóxico na maior concentração utilizada na linhagem TA102, na ausência de S9 mix. Na presença deste sistema metabólico, o efeito citotóxico não foi evidenciado, sugerindo a participação das enzimas do citocromo P450 na detoxificação de metabólitos gerados. Nas demais linhagens utilizadas, não houve efeito citotóxico.

Tabela 5 - Teste de mutagenicidade com cepas de *S. enterica* TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PAMT 09

PAMT 09	$\mu\text{g/mL}$	-S9			+S9		
		Média \pm DP	I.M.	% Sobr.	Média \pm DP	I.M.	% Sobr.
TA97	0	87 \pm 9,8	1,00	100	97 \pm 25	1,00	100
	0,05	89 \pm 4,5	1,02	100	74 \pm 5,5	0,76	100
	0,1	87 \pm 3,6	1,02	95	84 \pm 7,3	0,87	96
	0,5	92 \pm 4,9	1,07	85	87 \pm 2,0	0,90	95
	1,0	81 \pm 1,4	0,93	83	80 \pm 8,7	0,82	100
	CP	625 \pm 66	7,19*	71	929 \pm 195	9,55*	98
TA98	0	45 \pm 1,5	1,00	100	18 \pm 6,4	1,00	100
	0,05	58 \pm 9,6	1,28	100	17 \pm 1,0	0,91	100
	0,1	66 \pm 3,0	1,46	93	17 \pm 0,5	0,93	100
	0,5	50 \pm 5,8	1,10	97	21 \pm 4,0	1,14	100
	1,0	48 \pm 5,8	1,07	78	32 \pm 9,0	1,73	74
	CP	501 \pm 105	10*	81	36 \pm 11	3,95	94
TA100	0	120 \pm 23	1,00	100	117 \pm 19	1,00	100
	0,05	100 \pm 18	0,83	100	104 \pm 11	0,89	73
	0,1	96 \pm 9,5	0,80	100	126 \pm 12	1,08	73
	0,5	95 \pm 9,1	0,79	100	107 \pm 2,6	0,91	72
	1,0	100 \pm 14	0,83	100	107 \pm 10	0,92	71
	CP	1556 \pm 309	13*	100	246 \pm 64	2,10*	89
TA102	0	254 \pm 16	1,00	100	265 \pm 12	1,00	100
	0,05	285 \pm 30	1,12	79	275 \pm 17	1,04	100
	0,1	289 \pm 9,0	1,14	76	242 \pm 11	0,91	100
	0,5	282 \pm 28	1,11	73	256 \pm 10	0,97	100
	1,0	307 \pm 24	1,21	60	240 \pm 27	0,91	100
	CP	2360 \pm 312	9,28*	77	1817 \pm 223	6,86*	100

Legenda: valores expressos em média e desvio padrão (D.P.) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; *Diferença significativa ($p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Fonte: O autor, 2012.

No teste quantitativo de mutagenicidade, utilizando-se as linhagens derivadas de TA98 (tabela 6), na presença e na ausência de metabolização exógena S9 mix, o análogo

PAMT 09 não apresentou potencial mutagênico ($I.M. \geq 2$) para nenhuma das linhagens e concentrações utilizadas.

No teste quantitativo de citotoxicidade, utilizando-se as linhagens derivadas de TA98 (tabela 6), houve efeito citotóxico nas linhagens YG1021 e YG1024, na ausência e presença de S9 mix. Este efeito pode estar relacionado à presença das enzimas nitroredutases e acetiltransferases, respectivamente, que estariam metabolizando este análogo em intermediários tóxicos, podendo estar mascarando um possível efeito mutagênico.

Tabela 6 - Teste de mutagenicidade com cepas de *S. enterica* TA98 e suas derivadas TA98NR, YG1021, TA98/1,8-DNP₆ e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PAMT 09

PAMT 09	μg/mL	-S9			+S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA98	0	45 ± 1,5	1,00	100	18 ± 6,4	1,00	100
	0,05	58 ± 9,6	1,28	100	17 ± 1,0	0,91	100
	0,1	66 ± 3,0	1,46	93	17 ± 0,5	0,93	100
	0,5	50 ± 5,8	1,10	97	21 ± 4,0	1,14	100
	1,0	48 ± 5,8	1,07	78	32 ± 9,0	1,73	74
	CP	501 ± 105	10*	81	36 ± 11	3,95	94
TA98NR	0	17 ± 2,0	1,00	100	23 ± 3,7	1,00	100
	0,05	19 ± 4,9	1,11	90	15 ± 2,6	0,63	100
	0,1	27 ± 7,2	1,55	91	15 ± 0,5	0,68	100
	0,5	21 ± 11	1,23	92	15 ± 1,0	0,63	95
	1,0	16 ± 3,5	0,92	99	13 ± 3,2	0,56	81
	CP	36 ± 1,4	2,04*	10	928 ± 28	39*	40
YG1021	0	17 ± 3,2	1,00	100	19 ± 3,0	1,00	100
	0,05	13 ± 3,0	0,77	83	12 ± 3,0	0,61*	76
	0,1	13 ± 2,8	0,77	75	13 ± 3,0	0,69	79
	0,5	11 ± 0,5	0,65	68	10 ± 2,0	0,51	73
	1,0	6,0 ± 2,8	0,35	65	11 ± 1,1	0,58	51
	CP	117 ± 27	6,79*	83	992 ± 220	50*	48
TA98/1,8-DNP ₆	0	110 ± 24	1,00	100	60 ± 6,6	1,00	100
	0,05	156 ± 38	1,41	98	172 ± 12	0,91	100
	0,1	166 ± 17	1,50	100	144 ± 9,9	0,97	100
	0,5	150 ± 17	1,36	100	145 ± 3,5	0,83	100
	1,0	128 ± 43	1,16	100	112 ± 24	1,46	100
	CP	710 ± 111	6,42*	100	59 ± 5,0	2,80*	97
YG1024	0	12 ± 2,5	1,00	100	165 ± 66	1,00	100
	0,05	7,6 ± 5,6	0,62	29	66 ± 15	0,40	39
	0,1	8,3 ± 0,5	0,68	35	79 ± 23	0,48	39
	0,5	8,3 ± 0,5	0,68	36	100 ± 3,5	0,61	36
	1,0	9,5 ± 2,1	0,77	30	103 ± 29	0,62	36
	CP	251 ± 13	20*	34	1158 ± 347	6,99*	36

Legenda: valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; *Diferença significativa ($p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Fonte: O autor, 2012.

No teste quantitativo de mutagenicidade, utilizando-se as linhagens derivadas da TA100 e TA1535 (tabela 7), na presença e na ausência de metabolização exógena S9 mix, o análogo PAMT 09 não apresentou potencial mutagênico (I.M. ≥ 2) para nenhuma das linhagens e concentrações utilizadas.

No teste quantitativo de citotoxicidade (tabela 7), houve efeito citotóxico nas linhagens TA100NR e TA1535, apenas na presença de ativação metabólica S9 mix. Esta resposta sugere o envolvimento das enzimas do citocromo P450 (S9 mix) na geração de compostos reativos por atividade oxidativa levando ao efeito tóxico deste análogo. Além disto, este efeito pode estar mascarando um possível efeito mutagênico.

Tabela 7 - Teste de mutagenicidade com cepas de *S. enterica* TA100 e suas derivadas TA100NR, TA1535 e TA1535NR, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PAMT 09

PAMT 09	μg/mL	-S9			+S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA100	0	120 ± 23	1,00	100	117 ± 19	1,00	100
	0,05	100 ± 18	0,83	100	104 ± 11	0,89	73
	0,1	96 ± 9,5	0,80	100	126 ± 12	1,08	73
	0,5	95 ± 9,1	0,79	100	107 ± 2,6	0,91	72
	1,0	100 ± 14	0,83	100	107 ± 10	0,92	71
	CP	1556 ± 309	13*	100	246 ± 64	2,10*	89
TA100NR	0	109 ± 10	1,00	100	13 ± 2,0	1,00	100
	0,05	100 ± 2,5	0,92	100	12 ± 1,5	0,90	84
	0,1	93 ± 2,8	0,85	100	11 ± 1,1	0,83	75
	0,5	101 ± 2,8	0,92	100	3,0 ± 0,0	0,22	78
	1,0	105 ± 6,5	0,96	100	3,0 ± 0,0	0,22	58
	CP	377 ± 24	3,44*	94	277 ± 46	20*	86
TA1535	0	21 ± 7,2	1,00	100	5,3 ± 1,5	1,00	100
	0,05	19 ± 1,1	0,94	100	7,5 ± 0,7	1,41	68
	0,1	19 ± 2,3	0,92	100	9,5 ± 2,1	1,78	55
	0,5	32 ± 5,5	1,56	100	8,6 ± 1,5	1,63	59
	1,0	25 ± 0,5	1,21	85	7,0 ± 1,0	1,31	58
	CP	387 ± 35	18*	100	33 ± 7,2	6,25*	15
TA1535NR	0	9.0 ± 1,7	1,00	100	20 ± 2,0	1,00	100
	0,05	8.0 ± 2,9	0,89	100	20 ± 3,6	1,00	89
	0,1	10 ± 0,0	1,11	100	18 ± 1,4	0,90	99
	0,5	11 ± 2,6	1,22	96	23 ± 6,5	1,18	91
	1,0	7.3 ± 1,1	0,81	100	19 ± 1,4	0,95	88
	CP	533 ± 68	59*	100	42 ± 7,0	2,10*	56

Legenda: valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; *Diferença significativa ($p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Fonte: O autor, 2012.

6.2.2 Teste *in vitro* do micronúcleo com macrófago RAW 264,7

A genotoxicidade do análogo PAMT 09 foi avaliada na utilização do teste do micronúcleo com macrófago RAW 264,7 (tabela 4).

O análogo PAMT 09 induziu a formação de micronúcleos significativamente, nas duas menores concentrações utilizadas. Na maior concentração avaliada, observou-se diminuição de células em divisão ($p < 0,05$) e um aumento de células em apoptose ($p < 0,05$) e necrose, indicando efeito citotóxico dose-dependente.

Tabela 8 - Teste do micronúcleo com macrófagos RAW 264.7 utilizando o análogo do Megazol PAMT 09

Análogo	µg/mL	% I.Mi. ± DP	% Apop.	% Necr.	% Sobr.	% Micronúcleo ± DP
0	DMSO	6,0 ± 4,2	0,06	0,12	99,8	0,7 ± 0,4
	1,0	2,8 ± 1,6	2,68	0,00	97,3	4,0 ± 4,7
PAMT 09	10	1,2 ± 0,7*	7,32	0,06	92,6	2,7 ± 1,7*
	100	1,2 ± 1,7*	24,7*	0,22	75,0*	0,4 ± 0,2
CP	MNNG	5,2 ± 3,7	0,30	0,00	99,7*	2,8 ± 1,4*

Legenda: Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de quintuplicatas; 0: controle negativo; CP: controle positivo; I.Mi.: índice mitótico; Apop.: apoptose; Necr.: necrose; Sobr.: sobrevivência; DP: desvio padrão; *Diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: O autor, 2012.

6.3 PTAL 04-09

6.3.1 Teste quantitativo de mutagenicidade e citotoxicidade

No teste quantitativo de mutagenicidade, utilizando-se as linhagens padrão (tabela 9), na presença e na ausência de metabolização exógena S9 mix, o análogo PTAL 04-09 não apresentou potencial mutagênico (I.M. ≥ 2) para as linhagens TA97, TA98 e TA102. No

entanto, houve efeito mutagênico na linhagem TA100 ($p < 0,05$), tanto na presença quanto na ausência de S9 mix. Comparativamente, o I.M. foi menor na presença de metabolização exógena.

No teste quantitativo de citotoxicidade, utilizando-se as linhagens padrão (tabela 9), observou-se resposta positiva, na presença de S9 mix, em todas as concentrações utilizadas para a linhagem TA100, e apenas na maior concentração para a linhagem TA98. A diminuição do I.M. observada para a linhagem TA100 pode ser justificada pela resposta citotóxica a qual pode mascarar o real efeito mutagênico detectado.

Tabela 9 - Teste de mutagenicidade com cepas de *S. enterica* TA97, TA98, TA100 e TA102, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 04-09

PTAL 04-09	µg/mL	-S9			+S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA97	0	87 ± 9,8	1,00	100	97 ± 25	1,00	100
	1,0	85 ± 9,5	0,98	97	74 ± 13	0,76	77
	5,0	100 ± 5,7	1,15	100	80 ± 13	0,82	73
	10	115 ± 16	1,33	100	78 ± 16	0,80	77
	50	143 ± 11	1,65	100	82 ± 9,6	0,85	77
	CP	625 ± 66	7,19*	71	929 ± 195	9,55*	99
TA98	0	45 ± 1,5	1,00	100	18 ± 6,4	1,00	100
	1,0	66 ± 11	1,46	93	18 ± 8,5	0,98	100
	5,0	64 ± 3,0	1,40	100	17 ± 2,8	0,91	100
	10	65 ± 5,1	1,43	100	15 ± 1,5	0,82	71
	50	66 ± 7,0	1,45	100	16 ± 2,0	0,88	62
	CP	501 ± 105	10*	81	36 ± 11	3,95*	94
TA100	0	120 ± 23	1,00	100	117 ± 19	1,00	100
	1,0	113 ± 12	0,94	100	129 ± 18	1,11	66
	5,0	165 ± 12	1,37	100	144 ± 14	1,23	59
	10	192 ± 9,4	1,59	100	169 ± 9,4	1,45	60
	50	439 ± 39	3,64*	100	297 ± 12	2,53*	55
	CP	1556 ± 309	13*	100	246 ± 64	2,10*	89
TA102	0	254 ± 16	1,00	100	265 ± 12	1,00	100
	1,0	258 ± 19	1,02	100	266 ± 24	1,01	100
	5,0	262 ± 24	1,03	100	248 ± 9,1	0,94	100
	10	262 ± 31	1,03	100	260 ± 30	0,98	100
	50	274 ± 16	1,08	100	265 ± 7,6	1,00	100
	CP	2360 ± 312	9,28*	77	1817 ± 223	6,86*	100

Legenda: valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; *Diferença significativa ($p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Fonte: O autor, 2012.

No teste quantitativo de mutagenicidade, utilizando-se as linhagens derivadas da cepa TA98 (tabela 10), na presença e na ausência de metabolização exógena S9 mix, o

análogo PTAL 04-09 não apresentou potencial mutagênico ($I.M. \geq 2$) para as linhagens TA98NR, YG1021 e YG1024.

Na ausência de metabolização exógena, o análogo PTAL 04-09 foi mutagênico para linhagem TA98/1,8-DNP₆, em todas as concentrações utilizadas ($p < 0.05$). Este efeito pode estar relacionado à provável ligação direta do mutágeno gerando resposta mutagênica positiva. O mesmo efeito não foi observado na presença de S9 mix, sugerindo-se que ocorreu geração de metabolitos intermediários sem potencial mutagênico.

No teste quantitativo de citotoxicidade do análogo PTAL 04-09, assim como ocorre nas concentrações utilizadas dos análogos PAMT 09 e PTAL 05-02, houve acentuado efeito citotóxico, independente de metabolização exógena, na linhagem YG1024. Houve também efeito citotóxico para a linhagem YG1021, na presença e ausência de S9 mix, nas maiores concentrações utilizadas. Este efeito pode estar relacionado à presença das enzimas nitroreductase e acetiltransferase que estariam metabolizando este análogo em intermediários tóxicos.

Tabela 10 - Teste de mutagenicidade com cepas de *S. enterica* TA98 e suas derivadas TA98NR, YG1021, TA98/1,8-DNP₆ e YG1024, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 04-09

PTAL 04-09		-S9			+S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA98	0	45 ± 1,5	1,00	100	18 ± 6,4	1,00	100
	1,0	66 ± 11	1,46	93	18 ± 8,5	0,98	100
	5,0	64 ± 3,0	1,40	100	17 ± 2,8	0,91	100
	10	65 ± 5,1	1,43	100	15 ± 1,5	0,82	71
	50	66 ± 7,0	1,45	100	16 ± 2,0	0,88	62
	CP	501 ± 105	10*	81	36 ± 11	3,95	94
TA98NR	0	17 ± 2,0	1,00	100	23 ± 3,7	1,00	100
	1,0	16 ± 3,0	0,94	99	16 ± 4,9	0,70	71
	5,0	20 ± 5,7	1,15	95	16 ± 6,6	0,69	70
	10	16 ± 0,0	0,91	99	16 ± 8,5	0,69	74
	50	19 ± 3,6	1,08	100	21 ± 7,9	0,89	67
	CP	36 ± 1,4	2,04*	10	928 ± 28	39*	40
YG1021	0	17 ± 3,2	1,00	100	19 ± 3,0	1,00	100
	1,0	18 ± 3,5	1,06	75	12 ± 0,5	0,64	75
	5,0	16 ± 5,0	0,96	83	11 ± 4,3	0,56	76
	10	9,5 ± 0,7	0,55	84	10 ± 4,1	0,53	69
	50	9,0 ± 1,4	0,52	52	12 ± 4,0	0,61	57
	CP	117 ± 27	6,79*	83	992 ± 220	50*	48
TA98/1,8-DNP ₆	0	110 ± 24	1,00	100	60 ± 6,6	1,00	100
	1,0	307 ± 58	2,78*	100	60 ± 11	1,01	91
	5,0	315 ± 21	2,85*	100	63 ± 2,1	1,05	94
	10	292 ± 11	2,64*	100	60 ± 7,5	1,01	97
	50	297 ± 22	2,68*	100	53 ± 6,2	0,88	90
	CP	710 ± 111	6,42*	100	59 ± 5,0	2,80*	97
YG1024	0	12 ± 2,5	1,00	100	165 ± 6,6	1,00	100
	1.0	11 ± 3,5	0,93	20	118 ± 4,3	0,71	30
	5.0	14 ± 3,5	1,18	40	111 ± 9,6	0,67	30
	10	14 ± 4,9	1,19	30	62 ± 14	0,37	28
	50	4,5 ± 0,7	0,36	10	53 ± 14	0,32	22
	CP	251 ± 13	20*	34	1158 ± 347	6,99*	39

Legenda: valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; *Diferença significativa ($p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Fonte: O autor, 2012.

No teste quantitativo de mutagenicidade, utilizando-se as linhagens derivadas da TA100 e TA1535 (tabela 11), na presença e na ausência de metabolização exógena S9 mix, o análogo PTAL 04-09 não apresentou potencial mutagênico (I.M. ≥ 2) para nenhuma das linhagens e concentrações utilizadas.

No teste quantitativo de citotoxicidade (tabela 11), há resposta citotóxica nas linhagens TA100, TA1535 e TA1535NR, apenas na presença de S9 mix. Esta resposta sugere o envolvimento das enzimas do citocromo P450 (S9 mix) na geração de compostos reativos por atividade oxidativa levando ao efeito tóxico deste análogo, independente de enzimas nitroreductase, nas linhagens TA1535 e TA1535NR. E o envolvimento das enzimas nitroreductase e do citocromo P450, apenas na linhagem TA100.

Tabela 11 - Teste de mutagenicidade com cepas de *S. enterica* TA100 e suas derivadas TA100NR, TA1535 e TA1535NR, na presença e ausência de S9 mix, com o análogo do Megazol PTAL 04-09

PTAL 04-09	μg/mL	-S9			+S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA100	0	120 ± 23	1,00	100	117 ± 19	1,00	100
	1,0	113 ± 12	0,94	100	129 ± 18	1,11	66
	5,0	165 ± 12	1,37	100	144 ± 14	1,23	59
	10	192 ± 9,4	1,59	100	169 ± 9,4	1,45	60
	50	439 ± 39	3,64*	100	297 ± 12	2,53*	55
	CP	1556 ± 309	13*	100	246 ± 64	2,10*	89
TA100NR	0	109 ± 10	1,00	100	13 ± 2,0	1,00	100
	1,0	86 ± 5,7	0,78	90	7,0 ± 1,7	0,51	97
	5,0	78 ± 9,0	0,71	90	10 ± 2,0	0,73	92
	10	78 ± 8,5	0,71	100	13 ± 1,4	0,95	100
	50	74 ± 7,0	0,68	94	13 ± 2,3	1,00	98
	CP	377 ± 24	3,44*	94	277 ± 46	20*	86
TA1535	0	22 ± 3,2	1,00	100	5,3 ± 1,5	1,00	100
	1,0	21 ± 1,5	0,94	97	7,3 ± 1,1	1,38	41
	5,0	24 ± 2,0	1,09	95	8,3 ± 2,3	1,56	41
	10	25 ± 4,5	1,10	100	8,6 ± 1,1	1,63	39
	50	26 ± 1,5	1,18	93	5,6 ± 1,1	1,06	36
	CP	75 ± 12	3,31*	1.0	33 ± 7,2	6,25*	15
TA1535NR	0	9.0 ± 1,7	1,00	100	20 ± 2,0	1,00	100
	1,0	9.0 ± 1,0	1,00	100	14 ± 5,0	0,73	52
	5,0	9.0 ± 1,4	1,00	100	14 ± 3,5	0,73	52
	10	9.0 ± 0,0	1,00	100	14 ± 2,5	0,73	34
	50	12 ± 0,7	1,39	100	19 ± 2,0	0,96	31
	CP	533 ± 68	59*	100	42 ± 70	2,10*	56

Legenda: valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; *Diferença significativa ($p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Fonte: O autor, 2012.

6.3.2 Teste *in vitro* do micronúcleo com macrófago RAW 264,7

A genotoxicidade do análogo PTAL 04-09 foi avaliada na utilização do teste do micronúcleo com macrófago RAW 264,7 (tabela 12).

O análogo PTAL 04-09 induziu a formação de micronúcleos significativamente, em nas duas maiores concentrações utilizadas. No entanto, houve diminuição do aparecimento de células em divisão ($p < 0,05$) e apoptose ($p < 0,05$), indicando efeito citotóxico dose-dependente.

Tabela 12 - Teste do micronúcleo com macrófagos RAW 264,7 utilizando o análogo do Megazol PTAL 04-09

Análogo	µg/mL	% I.Mi. ± DP	% Apop.	% Necr.	% Sobr.	% Micronúcleo ± DP
0	DMSO	6,0 ± 4,2	0,06	0,12	99,8	0,7 ± 0,4
	1,0	3,2 ± 2,4	1,50*	0,00	98,5*	1,2 ± 0,8
PTAL 04-09	10	1,2 ± 1,4*	2,60*	0,00	97,4*	3,8 ± 1,6*
	100	0,4 ± 1,4*	10*	0,00	90,0*	3,8 ± 1,9*
CP	MNNG	5.2 ± 3.7	0,30	0,00	99,7*	2,8 ± 1,4*

Legenda: valores expressos em média e desvio padrão (DP) de quintuplicatas; 0: controle negativo; CP: controle positivo; I.Mi.: índice mitótico; Apop.: apoptose; Necr.: necrose; Sobr.: sobrevivência; DP: desvio padrão; *Diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: O autor, 2012.

7 DISCUSSÃO

Os 3 análogos (PAMT 09, PTAL 05-02 e PTAL 04-09) desenvolvidos a partir do Megazol apresentam poder tripanocida. Dentre eles, o análogo PTAL 04-09 ($IC_{50} = 120 \mu M$) é o mais sensível e tem atividade tripanocida mais próxima a do Megazol ($IC_{50} = 9,9 \mu M$). No entanto, os análogos, e todas substâncias bioativas com a possibilidade para uso em humanos, precisam ser avaliados através de testes toxicológicos para determinar as concentrações seguras de uso.

A primeira metodologia experimental recomendada para a avaliação toxicológica inicial de uma substância é o teste da mutação reversa bacteriana (teste da *Salmonella*/microsossoma ou teste de Ames) (OECD, 1997). É importante apontar que a *S. enterica* expressa altos níveis de nitroredutases, enzimas que atuam na redução de grupamentos nitro podendo formar intermediários mutagênicos e citotóxicos. Acredita-se que estas enzimas seriam responsáveis pelo mecanismo de ação presente na resposta mutagênica em bactérias pelos compostos do grupo nitroimidazol, como o Megazol e seus análogos e derivados, e que poderiam atuar também em células de mamíferos.

Com base nos resultados encontrados, utilizando as linhagens padrão de *S. enterica*, e organizados no quadro 5, correlacionou-se as concentrações mutagênicas e não mutagênicas, citotóxicas e não citotóxicas, com as concentrações de IC_{50} dos análogos, possibilitando determinar os limites seguros de uso.

De acordo com os dados do quadro 5, os valores máximos de mutagenicidade e citotoxicidade encontrados dos análogos, assim como os valores sem este tipo de resposta, estão abaixo dos valores necessários para que estas substâncias bioativas apresentem atividade tripanocida. Então, possivelmente os valores seguros de uso devam ser reavaliados quanto a eficiência tripanocida.

Porém, é importante comparar os resultados do teste de mutagenicidade e citotoxicidade dos análogos com os do Megazol presentes na literatura a fim de identificar as vantagens das modificações estruturais efetuadas nestes e determinar novas estratégias no desenvolvimento racional.

Ferreira e Ferreira (1986) evidenciaram o efeito mutagênico do Megazol nas linhagens TA98 e TA102, a partir da concentração de $0.1 \mu g/placa$, tanto na ausência quanto na presença de S9 mix. No entanto, o mesmo efeito não foi verificado na linhagem TA100, ao contrário dos resultados obtidos no tratamento com o análogo PTAL 04-09.

Quadro 5 - Correlação dos valores de IC₅₀ com as concentrações mínimas mutagênicas e citotóxicas, e concentrações máximas não mutagênicas e citotóxicas do Megazol e seus análogos utilizadas no tratamento das linhagens padrão de *S. enterica*

Substância	IC ₅₀ (μM)	< conc. mut. (μM)	> conc. sem efeito mut. (μM)	Relação IC ₅₀ / > conc. sem efeito mut.	< conc. cit. (μM)	> conc. sem efeito cit. (μM)
Megazol	9,9	0,23	NE	NE	4,5	2,3
PTAL 05-02	522,4	NE	4,9	112	0,48	0,24
PAMT 09	220	NE	3,6	61	NE	3,6
PTAL 04-09	120	260	52	2,3	5,2	NE

Legenda: valores de concentrações iniciais; Conc. mut.: concentração mutagênica; Conc. cit.: concentração citotóxica; mut.: mutagênico; cit.: citotóxico; NE: não encontrada.

Fonte: O autor, 2012.

A comparação dos resultados, nas linhagens padrão, do Megazol e de seus três análogos, evidenciou o grande intervalo existente entre a primeira concentração mutagênica do Megazol (0,1 μg/placa) e a primeira mutagênica do análogo PTAL 04-09 (5,0 μg/placa). Nos demais análogos (PAMT 09 e PTAL 05-02), não houve efeito mutagênico e citotóxico nas concentrações equiparadas (0,05 e 0,1 μg/placa). Porém, nestas concentrações, houve uma tendência dose-dependente no aumento da morte celular, sugerindo que valores ainda maiores poderiam evidenciar ação citotóxica, assim como ocorre para o Megazol.

Mello et al. (2009) (Apêndice) também evidenciaram o efeito mutagênico do Megazol nas linhagens padrão de *S. enterica* utilizando as seguintes concentrações: 0,005; 0,01; 0,02; 0,05 e 0,1 μg/placa. A menor concentração mutagênica do Megazol encontrada foi de 0,005 μg/placa para a linhagem TA102 enquanto a menor concentração mutagênica (5,0 μg/placa) das novas substâncias só foi encontrada para análogo PTAL 04-09, 1000 vezes maior.

Desta forma, demonstrou-se a capacidade mutagênica do Megazol e a diminuição deste potencial para os análogos utilizando as linhagens padrão. No entanto, é importante considerar que, apesar desta diminuição do potencial mutagênico, há também a necessidade de um valor de IC₅₀ maior para a manifestação do potencial tripanocida quando comparado ao Megazol, sugerindo que o grupo nitro da molécula responsável por esse potencial também é responsável pelo poder mutagênico.

Tendo em vista os resultados obtidos na análise mutagênica e citotóxica das linhagens padrão, foi interessante analisar o envolvimento das enzimas nitroredutases e acetiltransferases na ativação ou inativação metabólica dos análogos, na presença e ausência de S9 mix. Atribui-se efeito mutagênico, em bactérias, a metabolização de compostos nitro por este grupo de enzimas.

É relatado que as enzimas nitroredutase e acetiltransferase estão relacionadas à ativação de aminas aromáticas (grupo imidazol) por sucessivas reduções por 2 elétrons, formando intermediários aril-hidroxilaminas e ácidos aril-hidroxiâmico, sabidamente carcinogênicos e tóxicos (HEIN, 1988). Além disto, estes intermediários quando são metabolizados (hidroxilados) por enzimas acetiltransferase, geram metabólitos ésteres que formam adutos com proteínas e com DNA (YOSHIOKA et al., 1999). Então, sugere-se que este processo metabólico poderia estar envolvido no efeito citotóxico presente no tratamento da linhagem YG1024, supercompetente na síntese de acetiltransferase, com os 3 análogos utilizados.

Em estudos utilizando o Megazol (MORAIS et al., 1998), com as linhagens TA98, TA98NR e TA98/1,8-DNP₆, na presença e ausência de S9 mix, nas concentrações 0,05; 0,10; 0,25 e 0,5 µg/placa, houve resposta mutagênica e citotóxica para todas as linhagens e concentrações, executando-se a TA98NR, deficiente na síntese de nitroredutases. Este resultado evidenciou a importância das enzimas nitroredutase na ativação mutagênica e citotóxica do Megazol, ao passo que a metabolização exógena S9 mix e as enzimas acetiltransferase, não parecem influenciar na resposta mutagênica e citotóxica, nestas condições.

Na análise comparativa dos resultados de mutagenicidade do Megazol (MORAIS et al., 1998) e dos análogos, nas linhagens derivadas de TA98, foi possível constatar que o mecanismo de ação presente no potencial mutagênico do Megazol e de outros compostos do grupo nitroimidazol pode não estar presente nas concentrações utilizadas dos análogos. Na análise comparativa de citotoxicidade, houve similaridade na resposta citotóxica negativa da linhagem TA98NR, com exceção a maior concentração de PTAL 05-02 e PTAL 04-02. No entanto, houve divergência na análise dos resultados das linhagens TA98/1,8-DNP₆ e TA98, demonstrando a diminuição ou inibição do efeito tóxico dos análogos em comparação ao Megazol.

Com base nos resultados encontrados, utilizando as linhagens de *S. enterica* deficientes e supercompetentes na síntese de nitroredutases e acetiltransferases, e organizados no quadro 6, correlacionou-se as concentrações mutagênicas e não mutagênicas, citotóxicas e

não citotóxicas, com as concentrações de IC₅₀ dos análogos, possibilitando determinar os limites seguros de uso. No entanto, nas concentrações utilizadas, não houve valor seguro de uso.

Quadro 6 - Correlação dos valores de IC₅₀ com as concentrações mínimas mutagênicas e citotóxicas, e concentrações máximas não mutagênicas e citotóxicas do Megazol e seus análogos utilizadas no tratamento das linhagens de *S. enterica* deficientes e supercompetentes na síntese de nitroreduases e acetiltransferases

Substância	IC ₅₀ (μ M)	< conc. mut. (μ M)	> conc. sem efeito mut. (μ M)	Relação IC ₅₀ / > conc. sem efeito mut.	< conc. cit. (μ M)	> conc. sem efeito cit. (μ M)
Megazol	9,9	2,3	NE	NE	4,5	2,3
PTAL 05- 02	522,4	0,24	NE	NE	0,24	NE
PAMT 09	220	NE	3,6	61	0,18	NE
PTAL 04- 09	120	5,2	NE	NE	5,2	NE

Legenda: valores de concentrações iniciais; Conc. mut.: concentração mutagênica; Conc. cit.: concentração citotóxica; mut.: mutagênico; cit.: citotóxico; NE: não encontrada.

Fonte: O autor, 2012.

Nos testes bacteriológicos, o efeito mutagênico dos análogos surgiu em sistemas metabólicos específicos. No entanto, mesmo que o efeito mutagênico e citotóxico estejam presentes em condições específicas, os análogos são considerados mutagênicos e citotóxicos. Desta forma, concentrações ainda menores deveriam ser testadas para mutagenicidade e correlacionando-las com suas atividades tripanocida.

O teste do micronúcleo foi utilizado na avaliação do potencial genotóxico dos três análogos do Megazol na formação de células micronucleadas. Além disto, parâmetros como índice mitótico, células em apoptose e necrose foram mensurados para entender melhor o efeito genotóxico dos análogos trabalhados.

Para que haja a formação de células micronucleadas, é necessário que exista divisão celular (índice mitótico). Ou seja, a diminuição do índice mitótico leva a diminuição de células micronucleadas. Em contrapartida, o aumento de células em apoptose ou necrose é um indício de dano celular, de efeito tóxico.

Os 3 análogos foram capazes de induzir a formação de micronúcleos, assim como, nas maiores concentrações, demonstraram potencial citotóxico pela diminuição do índice mitótico, aumento de células em apoptose e necrose, e diminuição da sobrevivência celular.

O poder genotóxico do Megazol na formação de micronúcleos já foi relatada anteriormente (NESSLANY et al., 2004) e ratificada por outros testes toxicológicos (POLI et al., 2002). Os análogos também apresentaram efeito genotóxico.

Os resultados foram importantes, pois revelaram os possíveis mecanismos de ação pelos quais os análogos do Megazol atuaram, assim como evidenciaram uma diminuição do efeito mutagênico e citotóxico em comparação ao Megazol, colaborando para o futuro desenvolvimento de novas substâncias bioativas mais seguras.

Além disto, acredita-se que o efeito mutagênico encontrado nos testes bacteriológicos, e o efeito genotóxico, podem não estar presentes no tratamento *in vivo*. Como há a necessidade de confirmar estes resultados com estes testes, além de determinar a eficácia tripanocida dos análogos em modelos *in vivo*, estes resultados podem ser ratificados ou, como ocorre em determinados fármacos já em uso humano do grupo nitromizadol, não estarem presentes.

CONCLUSÕES

- a) Dentre os 3 análogos utilizados (PTAL 05-02, PAMT 09 e PTAL 04-09) no tratamento com as linhagens padrão de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, tanto na presença quanto na ausência de S9 mix, somente o análogo PTAL 04-09 foi mutagênico para a linhagem TA100. Os análogos PTAL 05-02 e PTAL 04-09 foram citotóxicos, na presença de S9 mix, para a linhagem TA100. O análogo PTAL 04-09 foi citotóxico, na presença de S9 mix, para a linhagem TA98. Os 3 análogos foram citotóxicos, na presença de S9 mix, para a linhagem TA1535;
- b) Os 3 análogos não foram mutagênicos para as linhagens deficientes na síntese de enzimas nitroredutase (TA98NR, TA100NR, TA1535NR), tanto na presença quanto na ausência de S9 mix. Os 3 análogos foram citotóxicos para as linhagens deficientes na síntese de enzimas nitroredutase, na presença de S9 mix. Os 3 análogos não foram mutagênicos para a linhagem YG1021, supercompetente na síntese de enzimas nitroredutase, tanto na presença quanto na ausência de S9 mix. Os análogos PAMT 09 e PTAL 04-09 foram citotóxicos para a linhagem supercompetente na síntese de enzimas nitroredutase, na ausência de S9 mix, e os 3 análogos apresentaram este efeito na presença de S9 mix;
- c) Os análogos PTAL 05-02 e PTAL 04-09 foram mutagênicos para a linhagem TA98/1,8-DNP₆, deficiente na síntese de enzimas acetiltransferase, na ausência de S9 mix. Os 3 análogos não foram citotóxicos para esta linhagem. Os 3 análogos não foram mutagênicos para a linhagem YG1024, supercompetente na síntese de enzimas acetiltransferase, tanto na presença quanto na ausência de S9 mix. Os 3 análogos foram citotóxicos para a linhagem YG1024, tanto na presença quanto na ausência de S9 mix;
- d) Os análogos PAMT 09, PTAL 05-02 e PTAL 04-09 foram genotóxicos aos macrófagos RAW 264,7, induzindo formação de micronúcleo e efeito tóxico.

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 câncer therapy: the search for tumor specificity. **Internacional 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. S. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. **Chemistry: an Asian Journal**, v. 6, n. 10, p. 2696-2718, 2011.
- 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.
- ANDRADE, Z. et al. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 201-230 p.
- ANDREOLLO, N. A., MALAFAIA, O. Os 100 anos da doença de Chagas no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Circulação Digital**, v. 22, n. 4, 2009.
- 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 in Italy: breaking na epidemiological silence. **European communicable disease bulletin**, v. 16, n. 37, p. 19969, 2011.
- 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.

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.

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.

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. 7, n. 5, 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.

BOUTEILLE, B. et al. Effect of megazol 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 megazol for the treatment of trypanosomiasis. **Médecine Tropicale: Revue du Corps de Santé Colonial**, v. 59, n. 4, p. 321-330, 1999.

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

BUCKER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 609-616, 2010.

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.

CHAUHAN, A.; SHARMA, P. K.; KAUSHIK, N. Pyrazole: a versatile moiety. **International Journal of Chemtech Research**, v. 3, n. 1, p. 11-17, 2011.

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.

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, 1961a.

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.; 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.; 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, 1961b.

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.

DE CARVALHO, M. E. et al. The Chagas disease control program of the São Paulo state: the contribution of serology to the epidemiological investigation of triatomine-infested domiciliar units during the 1990s. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 6, n. 18, p. 1695-1703, 2002.

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.; 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.

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.

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.

EHRENBERG, J. P.; AULT, S. K. Neglected diseases of neglected populations: thinking to reshape the determinants of health in Latin America and the Caribbean. **BMC Public Health**, v. 5, p. 119, 2005.

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.

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.

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, 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.

GESCHER, A. J.; SHARMA, R. A.; STEWARD, W. P. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. **The Lancet Oncology**, v. 2, n. 6, p. 371-379, 2001.

GRAEBIN, C. S. et al. Antiprotozoal agents: an overview. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v.8, n. 4, p. 345-366, 2009.

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 agents. **Farmaco**, v. 54, n. 11-12, p. 826-831, 1999.

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.

- 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.
- 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.
- JOSEPHY, P. D.; LORD, H. L.; SNECKUS, 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.
- 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.
- LEVY, B.; WEGMAN, D. G. **Occupational health: recognising and preventing work related disease and injury**. 4^o ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. 842 p.
- 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.
- 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.
- 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-MELO, F. R. et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 6, p. e1508, 2012.
- MASON, R. P.; JOSEPHY, P. P. **Free radical mechanisms of nitroreductase**. Washington: D. E. Rickert, 1985, 121-140 p.
- MAYA, J. D. et al. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 999-1006, 2003.
- MCKERROW, J. H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 263- 269, 2009.
- MELLO et al. **Avaliação mutagênica e genotóxica do Megazol**. Rio de Janeiro. 2009

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, 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.

MORAIS, M. A. et al. Mutagenic activation of CL64,855, an anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivant, 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.

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

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.

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

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guideline for testing of chemicals: carcinogenicity studies**. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9745101e.pdf?expires=1330562205&id=id&accname=freeContent&checksum=D3ADC52ECF8C691B3909C0F464A1674C>. Acesso em: 21 dez. 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guideline for testing of chemicals: bacterial reverse mutation test**. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/18/31/1948418.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guideline for testing of chemicals: in vitro mammalian cell micronucleus test**. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9748701e.pdf?expires=1330562495&id=id&accname=freeContent&checksum=D8648988807047F9571470F738D1B6B6>. Acesso em: dez. 2011.

PADILHA, B.; PEIXOTO, J. **Latin American immigration to Southern Europe.**

Disponível em: <http://www.migrationinformation.org/Feature/display.cfm?ID=609>. Acesso em: dez. 2011.

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

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

PORWOLLIK, S. et al. The DeltauvrB 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. Evaluation of experimental carcinogenicity studies for human risk assessment. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 72, n. 6, p. 725-744, 1991.

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.

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

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.

ROCHA, M. O.; RIBEIRO, A. L. 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.

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.

- 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.
- 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.
- 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: 21 dez. 2011.
- 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.
- TOLEDO, M. J. et al. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with diferente *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 1045-1053, 2004.
- 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. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto de Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 311-318, 2009.
- 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, 2003.

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.

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

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.

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.

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 (2010). **Control and prevention of Chagas disease in Europe**. Disponível em:
http://www.fac.org.ar/1/comites/chagas/Chagas_WHO_Technical%20Report_16_06_10.pdf. Acesso em: 21 dez. 2011.

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: 21 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: 21 dez. 2011.

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: 21 dez. 2011.

YOSHIOKA, M. et al. Glutathione S-transferase (GST) M1, T1, P1, N-acetyltransferase (NAT) 1 and 2 genetic polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer. **Journal of UOEH**, v. 21, n. 2, p. 133-147, 1999.

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.

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.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

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

APÊNDICE - Teste de mutagenicidade com cepas de *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 e TA102 na presença e ausência de S9 mix, com Megazol

Cepas	Megazol µg/placa	-S9			+S9		
		Média ± D.P.	I.M.	% Sobr.	Média ± D.P.	I.M.	% Sobr.
TA97	CN	49 ± 19	1,0	100	123 ± 26	1,0	100
	0,005	90 ± 10	1,8*	100	176 ± 18	1,4*	100
	0,01	116 ± 7	2,3*	100	168 ± 7	1,3*	100
	0,02	142 ± 20	2,8*	100	273 ± 11	2,2*	100
	0,05	165 ± 25	3,3*	100	408 ± 7	3,3*	80
	0,1	266 ± 31	5,4*	100	548 ± 111	4,4*	80
	CP	514 ± 22	10,0	40	746 ± 101	6,0	100
TA98	CN	27 ± 4	1,0	100	40 ± 4	1,0	100
	0,005	38 ± 11	1,3	92	33 ± 1	0,8	100
	0,01	49 ± 5	1,8*	97	39 ± 7	0,9	100
	0,02	81 ± 2	2,9*	100	41 ± 14	1,0	70
	0,05	211 ± 22	7,7*	93	87 ± 2	2,1	75
	0,1	356 ± 35	13,0*	57	116 ± 14	2,8*	77
	CP	410 ± 43	15,0*	100	297 ± 112	10,0*	24
TA100	CN	129 ± 12	1	100	171 ± 1	1	100
	0,005	228 ± 13	1,7*	72	324 ± 47	1,8*	100
	0,01	366 ± 59	2,8*	98	569 ± 58	3,3*	100
	0,02	739 ± 29	5,7*	70	691 ± 106	4,0*	100
	0,05	1302 ± 247	10,0*	80	1203 ± 190	7,0*	100
	0,1	2109 ± 476	16,0*	57	2041 ± 319	11,0*	50
	CP	542 ± 38	4,1*	100	445 ± 111	2,6	97
TA102	CN	197 ± 88	1	100	193 ± 77	1	100
	0,005	280 ± 4	1,4	100	408 ± 24	2,1*	100
	0,01	289 ± 45	1,4	100	459 ± 50	2,3*	100
	0,02	185 ± 80	0,9	100	594 ± 8,0	3,0*	100
	0,05	347 ± 38	1,7*	100	680 ± 60	3,5*	100
	0,1	313 ± 37	1,7*	100	666 ± 27	3,4*	100
	CP	1736 ± 83	8,7*	100	849 ± 195	4,3*	100

Legenda: valores são expressos como média e desvio padrão de triplicatas. CN (controle negativo): DMSO; CP (Controle Positivo, com e sem S9, respectivamente): 4-NQO e 2-AF (TA97), 4-NQO e 2-AF (TA98), AS e 2-AF (TA100), MitC (TA102); I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados de cada concentração utilizada e o controle negativo; D.P.: Desvio padrão; Sobr.: Sobrevivência; Indicação em **negrito** dos resultados com I.M. > 2 para mutagenicidade e, sobrevivência celular < 70 % para citotoxicidade.

Fonte: MELLO et al., 2012.