

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA - DOUTORADO
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Ana Claudia Manoel Von Trompowsky

ESTUDO DA GENOTOXICIDADE *in vitro* DE SUBSTÂNCIAS
NITROIMIDAZÓLICAS COMO INSTRUMENTO PARA BUSCA DE NOVOS
AGENTES TRIPANOMICIDAS

Rio de Janeiro

2016

Ana Claudia Manoel Von Trompowsky

ESTUDO DA GENOTOXICIDADE *in vitro* DE SUBSTÂNCIAS
NITROIMIDAZÓLICAS COMO INSTRUMENTO PARA BUSCA DE NOVOS
AGENTES TRIPANOMICIDAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Orientador: Helena Pereira da Silva Zamith

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Trompowsky, Ana Claudia Manoel Von

Estudo da genotoxicidade *in vitro* de substâncias nitroimidazólicas como instrumento para busca de novos agentes tripanomicidas/ Ana Claudia Manoel Von Trompowsky.- Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

151 f. : il

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientadora: Helena Pereira da Silva Zamith

1. Genotoxicidade. 2. Testes de Mutagenicidade. 3. Testes para Micronúcleos. 4. Nitroimidazóis. 5. Ensaio Cometa. 6. Doença de Chagas. I. Título

Study of genotoxicity *in vitro* nitroimidazoles substances as a tool to search for new tripanomicidas agents

Ana Claudia Manoel Von Trompowsky

**ESTUDO DA GENOTOXICIDADE *in vitro* DE SUBSTÂNCIAS
NITROIMIDAZÓLICAS COMO INSTRUMENTO PARA BUSCA DE NOVOS
AGENTES TRIPANOMICIDAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de doutor em Vigilância Sanitária

Aprovado em 05 /10 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marco Antonio Mota (Doutor)
Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Cristiane Caldeira da Silva (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutor) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

“A mente humana é a mais criativa e surpreendente invenção da própria natureza, em toda a sua evolução”.

José Elierre do Nascimento

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder a vida e me dar forças para continuar a lutar pelos meus objetivos, superando todos os obstáculos que me foram impostos e poder tornar tudo possível.

A minha família por ter me dado apoio, força, compreensão e encorajamento.

A minha mãe por ter abdicado da sua vida por completo durante esses últimos meses para ajudar a cuidar do meu filho para que eu pudesse finalizar este projeto. Serei eternamente grata!

A minha sogra que também quando solicitada sempre foi muito carinhosa e dedicada aos cuidados com meu filho.

Ao meu marido por nunca ter reclamado de todos os momentos de fraqueza que tive e como sempre caminhando ao meu lado nessa estrada da vida que nos leva ao melhoramento pessoal e profissional.

A minha orientadora Dra. Helena Pereira da Silva Zamith que sempre foi muito paciente, atenciosa, e disposta a me passar todo o seu vasto ensinamento no assunto abordado e por ter confiado a mim a responsabilidade de explorar o tema em questão.

Ao Cnpq/Capes pelo incentivo financeiro concedido.

As Amigas de Laboratório Renata Calil Lemos e Taline Ramos Conde que sempre me ajudaram muito na realização das técnicas laboratoriais.

Aos outros amigos de Departamento Mirian Vidal, Ronald Santos Silva, Izabela Gimenes, Cleuza Sodré por sempre acompanhar o desenvolvimento do estudo e torcer para finaliza o com êxito.

A Doutora Shirley de Mello Pereira Abrantes pela colabora o como revisora desta tese.

A todos os doadores voluntários que contribuíram para este trabalho e que tornaram possível sua realiza o.

RESUMO

A Doença de Chagas e do Sono são consideradas doenças tropicais negligenciadas, reforçando a necessidade de desenvolvimento de novo repertório de fármacos, além dos atualmente disponíveis. O Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) da FIOCRUZ desenvolveu sete substâncias análogas do megalozol (MGZ) (1) com boa atividade biológica, no intuito de obtenção de substâncias que causem uma menor incidência de efeitos colaterais e ausência de mutagenicidade. Este estudo propôs a utilização de sete substâncias nitroimidazólicas (2-8) análogas do MGZ (1) utilizando o bioisosterismo entre anéis e a mudança de posição do grupamento nitro esperando contribuir para o desenvolvimento de novas drogas nitroimidazólicas a serem empregados no tratamento da doença de Chagas e do Sono. O objetivo desse estudo foi avaliar a indução de quebra de fita de DNA foi abolida nessas substâncias nitroimidazólicas empregando-se o ensaio Cometa e o ensaio de micronúcleo em células sanguíneas humanas *in vitro*. O MGZ demonstrou efeito indutor de quebra de fita de DNA significativo ($P < 0,05$) nas concentrações 1562, 6400 e 10.000 μM e um efeito clastogênico e/ou aneugênico altamente significativo ($P < 0,01$) nas concentrações 1600 e 4000 μM . Os resultados obtidos no ensaio Cometa, com as 7 substâncias análogas, demonstrou em células sanguíneas humanas *in vitro* um resultado negativo para as substâncias (2-5) e resultados positivos para as substâncias (3,4,6,7 e 8). Os resultados no ensaio de micronúcleo em células sanguíneas humanas *in vitro* com as 7 substâncias análogas, demonstraram resultados negativos para as substâncias (3,4,6,7 e 8) e um resultado positivo para as substâncias (2-5). Na avaliação de genotoxicidade, as substâncias candidatas a drogas, os resultados obtidos no ensaio de micronúcleo são considerados mais relevantes em relação ao ensaio Cometa *in vitro*, por serem ensaios considerados teste padrão. Consideramos então, que a substância 8 foi a mais promissora das substâncias análogas ao MGZ (2,3,4,5,6,7) estudada, pois além da ausência de efeito clastogênico e/ou aneugênico em células sanguíneas humanas *in vitro*, apresentou alta atividade tripanomicida, sendo duas vezes superior ao benznidazol e ao MGZ.

Palavras-chave: Genotoxicidade, mutagenicidade, substâncias nitroimidazólicas, doença de Chagas, ensaio cometa *in vitro*, ensaio de micronúcleo *in vitro*

ABSTRACT

Chagas disease and Sleeping Sickness are considered neglected tropical diseases, reinforcing the need to develop new repertoire of drugs, in addition to the currently available. The Institute of Technology (Farmanguinhos) of FIOCRUZ Drugs developed seven similar substances megalol (MGZ) (1) with good biological activity in order to obtain substances that cause a lower incidence of side effects and lack of mutagenicity. This study suggested the use of substances nitroimidazoles seven (2-8) of similar MGZ (1) using the bioisosterism between rings and changing of the nitro group waiting to contribute to the development of new nitroimidazole drugs to be used in the treatment of Chagas and sleeping disease. The aim of this study was to evaluate the induction of DNA strand breaks was abolished in these nitroimidazoles substances employing the Comet assay and micronucleus assay clastogenic and/or aneugenic effect in human blood cells *in vitro*. The MGZ inductive effect showed significant DNA strand breaks ($P < 0.05$) at concentrations 1562, 6400 and 10,000 μM and clastogênico and / or aneugênico highly significant effect ($P < 0.01$) at concentrations 1600 and 4000 μM . The results obtained in the Comet assay, with 7 similar substances, demonstrated negative result *in vitro* human blood cells for substances (2-5) and positive results for substances (3,4,6,7 and 8). The results in the micronucleus test *in vitro* human blood cell 7 with analogous substances obtained negative results for substances (3,4,6 7 and 8) and a positive result for substances (2-5). In the evaluation of genotoxicity, substances candidates drug, results in the micronucleus test is considered more relevant in relation to the Comet assay *in vitro* tests considered to be pattern. We then consider that the substance 8 was the most promising of the similar substances to MGZ (2,3,4,5,6,7) studied because besides the absence of clastogenic and / or aneugênico effect on human blood cells *in vitro*, showed High trypanocidal activity, being twice the benzimidazole and MGZ.

Keywords: Genotoxicity, mutagenicity, nitroimidazole substances, Chagas disease, *in vitro* comet assay, micronucleus test *in vitro*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do NFT. Fonte: TOXNET.....	22
Figura 2	Estrutura química do BZN. Fonte: TOXNET.....	23
Figura 3	Estrutura química do MGZ. Fonte: TOXNET.....	27
Figura 4	Planejamento racional de análogos do megazol: estrutura química dos compostos nitroimidazólicos (1-8).....	39
Figura 5	Esquema da realização das etapas do ensaio Cometa (Procedimento Operacional Padronizado (POP/INCQS) nº 65.3330.011 (2015) baseado nas diretrizes estabelecidas por SPEIT; HARTMANN, (2006) e por TICE e colaboradores (2000).....	46
Figura 6	Célula binucleada de linfócito humano com a presença de um micronúcleo no citoplasma. Coloração pela laranja de acridina. Aumento de 400x. Fonte: Foto da própria autora.....	51
Figura 7	Efeito da substância 1 (megazol) na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) dos 3 ensaios Cometa realizados.....	60
Figura 8	Efeito da substância 2 na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) dos 2 ensaios Cometa realizados.....	71
Figura 9	Efeito da substância 3 na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) dos 2 ensaios Cometa realizados.....	78
Figura 10	Efeito da substância 4 na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) dos 2 ensaios Cometa realizados.....	85

Figura 11	Efeito da substância 5 na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) dos 2 ensaios Cometa realizados.....	92
Figura 12	Efeito da substância 6 na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) dos 2 ensaios Cometa realizados.....	99
Figura 13	Efeito da substância 7 na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) dos 3 ensaios Cometa realizados.....	107
Figura 14	Efeito da substância 8 na indução de dano ao DNA em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Barras representam os erros padrões das médias (EPM) das unidades arbitrárias totais (UAT) dos 2 ensaios Cometa realizados.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ensaio de citotoxicidade da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Tratamento: 2 h a 37 ⁰ C.....	57
Tabela 2	Ensaio de citotoxicidade da substância 2 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Tratamento: 2 h a 37 ⁰ C.....	69
Tabela 3	Ensaio de citotoxicidade da substância 3 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Tratamento: 2 h a 37 ⁰ C.....	75
Tabela 4	Ensaio de citotoxicidade da substância 4 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Tratamento: 2 h a 37 ⁰	82
Tabela 5	Ensaio de citotoxicidade da substância 5 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Tratamento: 2 h a 37 ⁰ C.....	90
Tabela 6	Ensaio de citotoxicidade da substância 6 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Tratamento: 2 h a 37 ⁰ C.....	96
Tabela 7	Ensaio de citotoxicidade da substância 7 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Tratamento: 2 h a 37 ⁰ C.....	103
Tabela 8	Ensaio de citotoxicidade da substância 8 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Tratamento: 2 h a 37 ⁰ C.....	111

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Ensaio Cometa 1 da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	57
Quadro 2	Ensaio Cometa 2 da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	58
Quadro 3	Ensaio Cometa 3 da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	59
Quadro 4	Ensaio Cometa da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 3 ensaios realizados.....	60
Quadro 5	Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> pelo bloqueio de citocinese da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas...	62
Quadro 6	Ensaio Cometa 1 da substância 2 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	69
Quadro 7	Ensaio Cometa 2 da substância 2 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	70
Quadro 8	Ensaio Cometa da substância 2 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados.....	71
Quadro 9	Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> pelo bloqueio de citocinese da substância 2 em células sanguíneas humanas.....	73
Quadro 10	Ensaio Cometa 1 da substância 3 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	76

Quadro 11	Ensaio Cometa 2 da substância 3 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	77
Quadro 12	Ensaio Cometa da substância 3 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados.....	78
Quadro 13	Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> pelo bloqueio de citocinese da substância 3 em células sanguíneas humanas.....	80
Quadro 14	Ensaio Cometa 1 da substância 4 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	83
Quadro 15	Ensaio Cometa 2 da substância 4 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	84
Quadro 16	Ensaio Cometa da substância 4 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados.....	85
Quadro 17	Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> pelo bloqueio de citocinese da substância 4 em células sanguíneas humanas.....	87
Quadro 18	Ensaio Cometa 1 da substância 5 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	90
Quadro 19	Ensaio Cometa 2 da substância 5 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	91
Quadro 20	Ensaio Cometa da substância 5 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados.....	92
Quadro 21	Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> pelo bloqueio de citocinese da substância 5 em células sanguíneas humanas.....	94

Quadro 22	Ensaio Cometa 1 da substância 6 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	97
Quadro 23	Ensaio Cometa 2 da substância 6 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	98
Quadro 24	Ensaio Cometa da substância 6 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados.....	99
Quadro 25	Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> pelo bloqueio de citocinese da substância 6 em células sanguíneas humanas.....	101
Quadro 26	Ensaio Cometa 1 da substância 7 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	104
Quadro 27	Ensaio Cometa 2 da substância 7 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	105
Quadro 28	Ensaio Cometa 3 da substância 7 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	106
Quadro 29	Ensaio Cometa da substância 7 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 3 ensaios realizados.....	107
Quadro 30	Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> pelo bloqueio de citocinese da substância 7 em células sanguíneas humanas.....	109
Quadro 31	Ensaio Cometa 1 da substância 8 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	112
Quadro 32	Ensaio Cometa 2 da substância 8 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.).....	113

Quadro 33	Ensaio Cometa da substância 8 em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> . Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados.....	114
Quadro 34	Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> pelo bloqueio de citocinese da substância 8 em células sanguíneas humanas.....	116
Quadro 35	Resumo dos resultados dos ensaios <i>in vitro</i> de citotoxicidade mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio no ensaio Cometa e da citotoxicidade mediada pelo Índice de Proliferação pelo Bloqueio de Citocinese (IPBC) e Índice de Replicação (IR) no ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> pelo bloqueio de citocinese do megazol (substância 1) e de seus análogos (2-8) em células sanguíneas humanas.....	120
Quadro 36	Resumo dos resultados quanto a genotoxicidade, mutagenicidade, e de dose letal do megazol (substância 1) e de seus análogos (2-8) em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> e suas atividades tripanomicidas <i>in vitro</i>	121

LISTA DE SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Baixo Ponto de Fusão
BrET	Brometo de Etídio
BZN	Benznidazol
CCB	Citocalasina B
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i> - Iniciativa de Desenvolvimento de Drogas para Doenças Negligenciadas
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMEA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHA-M	Fitohemaglutinina M
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HEPES	Ácido 4 – (2 – hidroxietil) piperazina-1-etanosulfônico
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC 50	Concentração inibitória média
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPBC	Índice de Proliferação de Bloqueio de Citocinese
IR	Índice de Replicação
MEM	Meio de cultura essencial mínimo
MGZ	Megazol
MMC	Mitomicina C
MN	Micronúcleo
MSM	Metanosulfonato de metila
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NFT	Nifurtimox

OECD	<i>The Organization for Economic Co-operation and Development</i> Organização para Cooperação e Desenvolvimento da Economia
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
FHA	Fitohemaglutinina
POP	Procedimento Operacional Padronizado
UA	Unidades Arbitrárias
UAT	Unidades Arbitrárias Totais
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 DOENÇA DE CHAGAS E DOENÇA DO SONO.....	17
1.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	21
1.3 TRATAMENTO DAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS.....	21
1.4 NITROIMIDAZÓIS.....	25
1.5 MEGAZOL.....	27
1.5.1 Estudos farmacocinéticos com o MGZ.....	30
1.6 ASPECTOS REGULATÓRIOS.....	31
1.7 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE.....	32
1.8 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	36
2. OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL.....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
3. METODOLOGIA	41
3.1 ENSAIO COMETA.....	41
3.1.1 Ensaio prévio de citotoxicidade mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio.....	41
3.1.2 Ensaio Cometa.....	43
3.1.3 Análise estatística.....	47
3.2 ENSAIO DE MICRONÚCLEO <i>in vitro</i> EM CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	47
3.2.1 Estabelecimento e tratamento das culturas de células sanguíneas humanas.....	47
3.2.2 Processamento das células e preparação das lâminas.....	50
3.2.3 Análise microscópica.....	51
3.2.4 Critérios para seleção das células binucleadas no ensaio de MN pelo bloqueio da citocinese.....	53
3.2.5 Critérios para análises de MNs no ensaio de MN pelo bloqueio da citocinese.....	54
3.2.6 Análise estatística.....	54
3.2.7 Avaliação e interpretação dos resultados.....	55

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 SUBSTÂNCIA 1 (MGZ).....	56
4.1.1 Ensaio Cometa.....	56
4.1.2 Ensaio Micronúcleo.....	61
4.1.3 Importância do estudo da genotoxicidade de análogos ao MGZ.....	63
4.1.4 Ensaios Cometa e Micronúcleo <i>in vitro</i> do MGZ (substância 1) – contextualização com os dados da literatura.....	65
4.1.4.1 <i>Atividade Tripanomicida do MGZ</i>	67
4.2 SUBSTÂNCIA 2.....	68
4.2.1 Ensaio Cometa.....	68
4.2.2 Ensaio Micronúcleo.....	72
4.2.3 Ensaios Cometa e Micronúcleo <i>in vitro</i> da substância 2 – contextualização com os dados da literatura.....	74
4.3 SUBSTÂNCIA 3.....	75
4.3.1 Ensaio Cometa.....	75
4.3.2 Ensaio Micronúcleo.....	79
4.3.3 Ensaios Cometa e Micronúcleo <i>in vitro</i> da substância 3 – contextualização com os dados da literatura.....	81
4.4 SUBSTÂNCIA 4.....	82
4.4.1 Ensaio Cometa.....	82
4.4.2 Ensaio Micronúcleo.....	86
4.4.3 Ensaios Cometa e Micronúcleo <i>in vitro</i> da substância 4 – contextualização com os dados da literatura.....	88
4.5 SUBSTÂNCIA 5.....	89
4.5.1 Ensaio Cometa.....	89
4.5.2 Ensaio Micronúcleo.....	93
4.5.3 Ensaios Cometa e Micronúcleo <i>in vitro</i> da substância 5 – contextualização com os dados da literatura.....	95
4.6 SUBSTÂNCIA 6.....	95
4.6.1 Ensaio Cometa.....	95
4.6.2 Ensaio Micronúcleo.....	100
4.6.3 Ensaios Cometa e Micronúcleo <i>in vitro</i> da substância 6 – contextualização com os dados da literatura.....	102
4.7 SUBSTÂNCIA 7.....	103

4.7.1	Ensaio Cometa.....	103
4.7.2	Ensaio Micronúcleo.....	108
4.7.3	Ensaio Cometa e Micronúcleo <i>in vitro</i> da substância 7 – contextualização com os dados da literatura.....	110
4.8	SUBSTÂNCIA 8.....	111
4.8.1	Ensaio Cometa.....	111
4.8.2	Ensaio Micronúcleo.....	115
4.8.3	Ensaio Cometa e Micronúcleo <i>in vitro</i> da substância 8 – contextualização com os dados da literatura.....	117
4.9	IMPORTÂNCIA DOS ENSAIOS COMETA E MICRONÚCLEO EM ESTUDOS DE GENOTOXICIDADE DE NOVAS DROGAS CANDIDATAS.....	118
4.10	RESUMO DOS RESULTADOS DO ENSAIO COMETA E DO ENSAIO DE MICRONÚCLEO.....	120
4.11	RESUMO DOS RESULTADOS DO ENSAIO COMETA E DO ENSAIO DE MICRONÚCLEO QUANTO A GENOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E DOSE LETAL.....	121
5	CONCLUSÕES.....	122
6	PERSPECTIVAS.....	123
	REFERÊNCIAS.....	124
	ANEXO 1	137
	APÊNDICE A	138
	APÊNDICE B	142
	APÊNDICE C.....	143
	APÊNDICE D.....	148

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS E DOENÇA DO SONO

As tripanossomíases americana (doença de Chagas) e a africana (doença do sono) que exibem alta morbidade são causadas por protozoários do gênero *Trypanosoma*, tendo como vetores insetos hematófagos (DIAS et al., 2009). As tripanossomíases são consideradas doenças tropicais negligenciadas (DTNs), que afetam predominantemente os indivíduos mais pobres e mais vulneráveis.

Negligenciadas, mas não desconhecidas, estas doenças são preveníveis e tratáveis e importantes em termos de saúde pública, pois as iniciativas ainda não foram suficientes por parte dos órgãos competentes para desenvolver medicamentos eficazes e seguros para a população afetada (RATH et al., 2003; NEGLECTED..., 2014).

Para excluir a condição de negligenciadas das DTNs, parcerias públicas e privadas foram estabelecidas - com empresas farmacêuticas, doadores e instituições governamentais - comprometidas com o que agora é conhecido como a “Declaração de Londres” de 2012 para controlar, eliminar ou erradicar até 2020, dez DTNs (dentre elas, a doença de Chagas e a tripanossomíase africana humana). Compromissos foram assumidos para garantir o fornecimento de drogas, para se avançar em pesquisas e em desenvolvimento, para melhorar a colaboração e a coordenação em nível nacional e internacional, permitindo assim, o financiamento adequado e o monitoramento dos programas (NEGLECTED..., 2014).

Em 2014, líderes mundiais da área de saúde se reuniram no Instituto Pasteur em Paris para a apresentação do relatório *Uniting to Combat NTDs: Delivering on Promises and Driving Progress* (“União para o Combate das DTNs: Cumprimento dos Compromissos e Progresso de Condução”), que avaliou os ganhos e retrocessos no sentido de atingir as metas de 2020 referentes às DTNs.

Em relação à doença de Chagas, de acordo com o relatório, confirmou-se que todos os pacientes recém-infectados e os doentes crônicos necessitam de tratamento com drogas e que ainda, atualmente, menos do que 1% dos pacientes recebem tratamento. A qualidade das drogas existentes foi considerada um fator

importante que contribui, assim como os tratamentos disponíveis para ambos os tipos de pacientes que exigem tratamentos prolongados que causam sérios efeitos colaterais. O desenvolvimento de melhores esquemas de tratamento com as drogas atuais, notadamente, com o benznidazol (BZN), e de novos medicamentos, mais seguros e mais eficazes foi considerado, portanto, vital (UNITING TO COMBAT NTDS, 2014a).

Estudo divulgado em 2013 com uma droga experimental azólica, E1224, produzida pela empresa farmacêutica japonesa Eisai Co. Ltda mostrou pouca eficácia em relação ao BZN, como único tratamento médico e confirmou a eficácia do BZN. O estudo se iniciou em 2009, a partir da parceria estabelecida entre a Iniciativa de Desenvolvimento de Drogas para Doenças Negligenciadas (DNDi) e a Eisai para o desenvolvimento de E1224 para a doença de Chagas. A fase II do estudo começou em julho de 2011 em Cochabamba e Tarija, na Bolívia, onde se avaliou o potencial de E1224 como um tratamento para a doença de Chagas e explorou biomarcadores de resposta terapêutica. Este estudo avaliou três regimes de dosagem orais, e de dosagem padrão de BZN (5 mg/p.c./dia). Os resultados preliminares, divulgados em novembro de 2013, indicaram que a droga candidata experimental E1224 foi eficaz na erradicação do parasita causador da doença de Chagas no final do curso de tratamento, mas não sustentou a sua eficácia após um ano de tratamento como único medicamento. Poucos pacientes que receberam a dose mais elevada interromperam o tratamento com o E1224 devido a efeitos colaterais, porém em menor quantidade do que no grupo tratado com BZN. O tratamento com o BZN mostrou-se mais eficaz a longo prazo (como monoterapia), mas continuou preocupante quanto à segurança e tolerabilidade (DNDi, 2014). O conhecimento e os dados gerados através deste estudo proporcionaram novos planos de estudo que explorarão combinações destas drogas e tratamentos mais curtos, bem como, esquemas de tratamento mais seguros com BZN. O Fexnidazol está também sendo considerado como possível tratamento para a doença de Chagas (UNITING TO COMBAT NTDS, 2014a).

De acordo também com o relatório referente ao combate das DTNs, iniciativas que contemplem a rápida informação de diagnóstico da doença de Chagas estão mostrando sinais encorajadores. Um estudo realizado pelos Médicos Sem Fronteiras e pela Organização Mundial de Saúde com o objetivo de se achar uma combinação

de diagnóstico eficiente e rápido para a doença de Chagas entrou em sua segunda fase (UNITING TO COMBAT NTDS, 2014a).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima em aproximadamente 6 a 8 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, a maioria na América Latina. Estimativas recentes para 21 países latino-americanos, com base em dados de 2010, indicavam 5.742.167 pessoas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, das quais 3.581.423 (62,4%) eram residentes em nações da Iniciativa dos Países da América do Sul e Central, destacando-se a Argentina (1.505.235), o Brasil (1.156.821) e o México (876.458), seguidos da Bolívia (607.186). Todavia, estes dados divergem de outras estimativas realizadas por diferentes grupos de pesquisa e métodos para definição de infecção por *T. cruzi* em vários países, o que dificulta o estabelecimento exato da prevalência da doença de Chagas nas Américas (DIAS et al, 2016).

O custo do tratamento para a doença de Chagas continua a ser substancial. Somente na Colômbia, o custo anual dos cuidados médicos para todos os pacientes com a doença de Chagas foi estimado em cerca de 267 milhões de dólares no ano de 2008. A pulverização de inseticidas para o controle dos vetores, custaria cerca de 5 milhões de dólares ao ano (WHO, 2014).

A doença de Chagas é uma enfermidade de caráter crônico, ocorre principalmente na América Latina, onde a doença é considerada endêmica. Estima-se que, mundialmente, cerca de sete a oito milhões de pessoas estejam infectadas com *Trypanosoma cruzi*, predominantemente na América Latina, e nos Estados Unidos. No entanto, nas últimas décadas, o movimento da doença de Chagas em áreas anteriormente consideradas não endêmicas, resultante da crescente mobilidade da população entre a América Latina e o restante do mundo, representa um sério desafio de saúde pública. Casos de doença de Chagas têm sido encontrados em países europeus, Japão, Austrália e nos EUA (UNITING TO COMBAT NTDS, 2014a; WHO, 2014).

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é transmitida pelos excrementos de insetos triatomíneos (*Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*) conhecidos como “barbeiros”. A principal via de transmissão é a vetorial, seguida das vias sanguínea (transfusão), vertical (placentária), oral e acidental (BRASIL, 2005). A fase aguda (frequentemente na idade infantil), aparece até 10 dias após a infecção, permanecendo por cerca de 4 meses e apresentando inflamação no sítio da infecção e gânglios linfáticos, febre, sudorese, hepatomegalia e esplenomegalia.

À medida que a doença progride, durante 5 a 30 anos, os sintomas tornam-se graves e crônicos, sendo classificada agora como indeterminada (observada na maioria dos indivíduos infectados), na qual os pacientes podem transmitir o parasita, apesar de não apresentarem sinais da doença (OLIVEIRA et al., 2008). Entre 20 a 30% desses pacientes, evoluem para a fase crônica, com problemas digestivos relacionados a destruição da rede neuronal mioentérica, mais frequentemente no esôfago e no intestino grosso, como megaesôfago e megacólon (DIAS et al., 2009; NESSLANY, 2004).

Apesar dos avanços alcançados, as tripanossomíases ainda representam um sério problema de saúde pública pela sua peculiar epidemiologia, caracterizada pela diversidade de situações de risco; por não dispor de medidas profiláticas e esquemas terapêuticos mais eficientes, menos tóxicos e de baixo custo; falta de marcadores biológicos para a avaliação precoce da eficácia da droga antiparasitária e resposta clínica; e pela falta de um entendimento mais completo da fisiopatologia da evolução da doença crônica. Desta forma são necessárias ações concretas de saúde pública no sentido de expandir e sustentar os esforços de controle epidemiológico, além de se desenvolver soluções mais definitivas, incluindo aquelas relacionadas à quimioterapia (OLIVEIRA et al., 2008).

O *Trypanosoma brucei* é o agente etiológico da doença do sono, cujos vetores são insetos do gênero *Glossina*, mais conhecidos como moscas tsé-tsé. A doença afeta principalmente as populações pobres que vivem em áreas rurais da África. A fase aguda da doença do sono tem como principais sintomas o cansaço, as febres irregulares, tremores, dores musculares e articulares, mal estar, perda de peso, anemia, trombocitopenia e o aumento dos folículos linfáticos no baço. Na fase crônica, o parasita atravessa a barreira hemato-encefálica e migra para o sistema nervoso central, onde várias alterações neurológicas podem surgir, incluindo transtornos psiquiátricos, convulsões, coma e morte (WHO, 2014). Estima-se que atualmente 70 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença do sono e 7.216 casos foram reportados só no ano de 2012 (UNITING TO COMBAT NTDS, 2014a).

Em pacientes imunodeprimidos, como os portadores de neoplasias hematológicas, os usuários de drogas imunodepressoras, ou os co-infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (AIDS), pode haver reativação da doença de Chagas, pela persistência do parasito. A necessidade de tratamento e

profilaxia secundária tem levado a vários protocolos para estas infecções (BRASIL, 2005; OLIVEIRA et al., 2008).

1.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Os exames parasitológicos utilizados como critério de cura para as tripanossomíases incluem xenodiagnóstico, hemocultura e reação em cadeia de polimerase (PCR). O diagnóstico da doença do sono exige confirmação da presença do parasita em qualquer fluido corporal. O diagnóstico precoce é difícil, devido à falta de sinais ou sintomas específicos, e na primeira fase da doença principalmente por causa da falta de sensibilidade dos métodos parasitológicos disponíveis (WHO, 2014). Em consequência da baixa parasitemia na fase crônica das doenças de Chagas e do sono, exames parasitológicos com resultados negativos não significam cura parasitológica. O resultado de um único exame parasitológico positivo, após conclusão do tratamento, indica que o fármaco não foi eficaz (BRASIL, 2005; OLIVEIRA et al., 2008).

1.3 TRATAMENTO DAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

Por muitas décadas, a descoberta de substâncias bioativas se baseou em conhecimentos de química e biologia básica e em uma abordagem “tentativa e erro” guiada por modelos experimentais em culturas de células (*in vitro*) ou em animais (*in vivo*). A evolução desse processo deu origem à era do planejamento de fármacos, que teve como elemento fundamental a mudança de paradigma caracterizada pelo entendimento de que os sistemas químicos tinham papel determinante na modulação de sistemas biológicos (DIAS et al., 2009; ROMANHA et al, 2010).

O nifurtimox (NFT) e o BZN foram introduzidos na clínica nas décadas de 60-70, sendo o NFT comercializado pela Bayer em 1967 com o nome comercial Lampit[®] e o BZN comercializado pela Roche em 1972 como Rochagan[®] (COURA; CASTRO, 2002). Nenhum destas substâncias são consideradas ideais, pois não são

praticamente ativas durante a fase crônica da doença, apresentam sérios efeitos colaterais, como a toxicidade dose-dependente, e requerem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica apresentando alto custo (ENANGA et al., 2003; MAYA et al., 2003; SALOMÃO et al., 2010). Atuam por meio de formação de radicais livres e/ou metabólitos nucleofílicos, indução do ciclo redox, explicando seus efeitos tóxicos, através da produção de radicais hidroxila (MAYA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008; MITAL, 2009). Adicionalmente, tem sido relatado que as tripanossomíases apresentam-se resistentes a ambas substâncias, não se dispondo de formulação de medicamento pediátrico, apesar do fato de que crianças até 12 anos possuem maiores chances de cura, por não apresentarem ainda a sintomatologia crônica da doença (DIAS et al., 2009).

O NFT (figura 1) (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) é um derivado nitrofurânico usado para tratar a doença de Chagas. Sabe-se que seu mecanismo de ação envolve a formação de radicais nitro instáveis por nitroredutases, e que na presença de oxigênio causam aumento intracelular dos níveis de H_2O_2 , e radicais livres hidroxila tóxicos ao parasito. O *T.cruzi* mostrou-se deficiente em mecanismos de destoxificação para metabólitos de oxigênio, principalmente o H_2O_2 tornando-se assim, mais sensível ao estresse oxidativo que as células dos vertebrados (MAYA et al., 2003). A eficácia da droga em pacientes crônicos é baixa, o índice de cura varia de 7% a 8%, enquanto que em crianças, ocorre em 85,7% dos casos (OLIVEIRA et al., 2008). Os tipos e as frequências de reações adversas causadas pelo NFT são pouco documentados, sendo comum a anorexia, perda de peso, sonolência, alterações neurológicas, náuseas, vômitos e ocasionalmente cólicas intestinais (OLIVEIRA et al., 2008; DIAS et al., 2009). O NFT não é medicamento aprovado para o tratamento da doença do sono, mas é utilizado como último recurso nos casos refratários aos compostos arsenicais (REY, 2001).

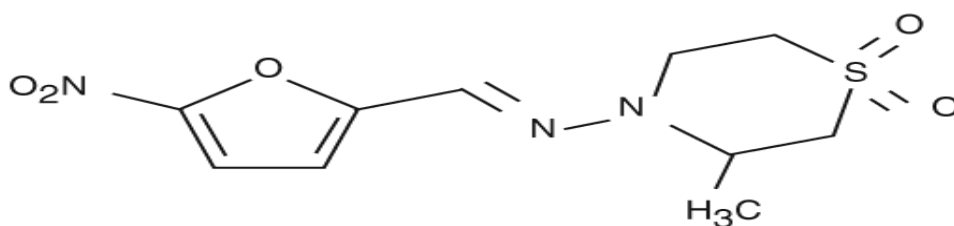


Figura 1= Estrutura química do NFT. Fonte: TOXNET

O BZN (figura 2) (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) é um derivado nitroimidazólico, que está sendo usado atualmente como o principal medicamento para tratar a doença de Chagas, havendo uma melhor tolerância por parte dos pacientes infectados em relação ao NFT, mesmo quando comparado com doses baixas (MAYA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008).

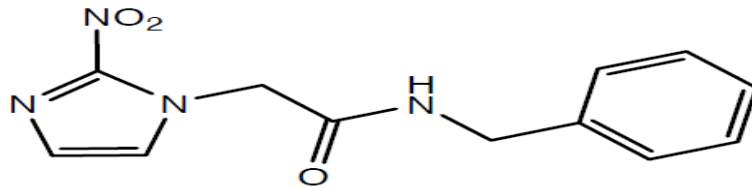


Figura 2 = Estrutura química do BZN. Fonte: TOXNET

O BZN é administrado na fase aguda e crônica (forma indeterminada) da doença de Chagas, em crianças até 12 anos, na dose de 5 mg/p.c., por via oral, dividida a cada 12 horas, durante 30 a 60 dias. Em adultos, na fase aguda, a dose administrada é de 5 a 7 mg/p.c., por via oral, dividida a cada 12 horas, durante 60 dias; na fase crônica (forma indeterminada), a dose é de 3mg/p.c., por via oral, dividida a cada 12 horas, durante 90 dias; na fase crônica (forma clínica inicial), a dose é de 10 mg/p.c., por via oral, dividida a cada 12 horas durante 50 dias (BRASIL, 2010). Sua ação antiparasitária tem potencial redox negativo, não envolvendo danos oxidativos. Seu mecanismo de ação tripanomicida ainda não está totalmente elucidado, mas pode agir por meio da formação de radicais livres e de metabólitos eletrofílicos que são gerados quando o seu grupamento nitro é reduzido a um grupamento amina por meio da ação de nitroredutases, mas pouco se sabe sobre suas consequências fisiológicas. É rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e é, principalmente, metabolizado no fígado pelo sistema enzimático do citocromo P450, e sua excreção ocorre através da urina e das fezes (MAYA et al, 2007). É descrito ainda que o BZN aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama (IFN-g) e inibe o crescimento do *T. cruzi* através da enzima NADH-fumarato redutase (DIAS et al., 2009).

Em virtude da acentuada toxicidade, o BZN não pode ser empregado em larga escala e requer acompanhamento laboratorial. Nos pacientes tratados com este medicamento, o xenodiagnóstico torna-se negativo durante a administração

(efeito supressivo), mas na maioria dos casos, o teste volta a ser positivo algum tempo depois do tratamento (BRASIL, 2005). Segundo Dias e colaboradores (2009), em cerca de 20% a 30% dos pacientes, os efeitos colaterais mais frequentes podem ser agrupados de três formas: (i) manifestações de hipersensibilidade, como dermatite com erupção cutânea (usualmente entre o 7^o e 10^o dia de tratamento), edema periorbital ou generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares; (ii) depressão da medula óssea, incluindo neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica; e (iii) polineuropatia periférica, representada por parestesias e polineurite, provavelmente como consequência dos danos redutivos no tecido do hospedeiro. O BZN é considerado mutagênico e por isso deve ser evitado durante a gravidez (MARTINDALE, 2014).

Apenas quatro drogas são registradas para o tratamento da doença do sono: pentamidina, suramina, melarsoprol e eflornitina. No entanto, todas têm um certo grau de toxicidade. A pentamidina é usada na fase aguda, sendo eficaz contra o *T. brucei*, na dosagem de 4 mg/p.c./dia, por via intramuscular, por um período de 10 dias, repetindo a cada 6 meses, como profilaxia; e a suramina contra o *T. rhodesiense*. No entanto, a resistência do parasita é crescente a estes fármacos. O melarsoprol é usado na fase crônica da doença, sendo o único tratamento disponível. Eflornitina pode ser usada em monoterapia. Após a sua inclusão na lista de medicamentos essenciais da OMS em abril de 2009, a combinação de eflornitina e o NFT foi adotada como tratamento. A combinação das duas drogas reduz a duração do tratamento em monoterapia sendo também mais fácil a administração, mantendo o mesmo nível de eficácia e segurança. Todos os medicamentos atuais usados para o tratamento da doença do sono são doados à OMS para distribuição gratuita pelos fabricantes: Sanofi® e Bayer® (WHO, 2014).

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos engloba várias estratégias e uma combinação de métodos tradicionais e modernos, de natureza intrinsecamente multi e interdisciplinar, integrando especialidades como a química, biologia, medicina, farmácia, bioquímica, farmacologia, bioinformática, entre outras. A maioria dos pesquisadores perdeu o interesse em desenvolver estudos tão longos diante das dificuldades para avaliar os critérios de cura dos pacientes chagásicos submetidos ao tratamento. Nessas circunstâncias, quando não existe uma correlação clínica que confirme, consideram-se curados aqueles pacientes cujos testes sorológicos e parasitológicos se tornam negativos (DIAS et al., 2009).

Atualmente, a decisão oficial dos Ministérios da Saúde do Brasil, da Argentina e da Bolívia é prover o tratamento tanto dos casos agudos como dos crônicos recentes. Porém buscando-se novas drogas com alta atividade antiparasitária e melhor perfil de segurança no tratamento dos portadores da infecção chagásica. O grande desafio atual, além do desenvolvimento de drogas mais eficazes (uma vez que os parasitas acabam desenvolvendo, através de mecanismos diversos, resistência aos quimioterápicos mais frequentemente usados), e com menos efeitos adversos, é também capacitar profissionais de saúde para o diagnóstico e tratamento da doença (OLIVEIRA et al., 2008).

1.4 NITROIMIDAZÓIS

A classe dos nitroimidazóis foi descoberta em 1955 após cientistas franceses do grupo Rhône-Poulenc descreverem a atividade de um extrato de *Streptomyces* 6670 contra *Trichomonas vaginalis*. Esse extrato já havia sido analisado em 1953 por alguns pesquisadores. Em 1957, esses cientistas do grupo Rhône-Poulenc sintetizaram o metronidazol baseados em modificações da estrutura química da azomicina. Este foi comercializado a partir de 1960, sendo o primeiro fármaco para o tratamento contra infecções por protozoários e bactérias anaeróbias (BUSATTI, 2006; MORETH et al., 2010). Além disso, nitroimidazóis tem outras propriedades interessantes, incluindo atividades para o tratamento de tuberculose bem como antifúngicos; no controle de fertilidade; e contra a transcriptase inversa recombinante de vírus da imunodeficiência humana (HIV) -1 (SILVESTRI et al., 2002; AL-SOUD et al., 2007; BOECHAT et al., 2015).

Os nitroimidazóis, assim como os nitrocompostos em geral, têm sido alvo de inúmeras discussões sobre sua mutagenicidade, já que a atividade biológica dessa classe, ao que tudo indica, parece estar relacionada aos danos causados pelos produtos de biorredução do grupo nitro ao DNA (MORETH et al., 2010). De fato, em estudos *in vitro*, nitroimidazóis apresentam mutagenicidade pelo teste de Ames realizado em *Salmonella typhimurium* (EDWARDS, 1993).

Dentre todas as substâncias com atividade tripanomicida e antiparasitárias, a classe dos nitroimidazóis é a que mais contribui para o tratamento das doenças

causadas por tripanossomatídeos devido ao seu amplo espectro e alta atividade. Entretanto, são pouco utilizados clinicamente por causa dos efeitos carcino-mutagênicos que podem surgir devido à necessidade de seu uso prolongado (PERIE et al., 1999; MAYA et al., 2003).

Diversos estudos mostram que células de mamíferos, bactérias e protozoários tem capacidade de reduzirem os nitroimidazóis. Células de mamíferos são, de maneira geral, oxigenadas e possuem sistemas redox de transferência de elétrons com alto potencial de oxiredução. O principal acceptor de elétrons desses sistemas são NAD^+ ou NADP^+ , ambos apresentando potencial de redução de -320mV , valores bem mais altos que dos sistemas microbianos, que possuem potencial de redução de -420 mV ou menos. Além disso, nitroimidazóis apresentam diferentes potenciais de redução de acordo com a posição do grupo nitro. Para 4 e 5-nitroimidazóis o potencial de redução é de cerca de -485 a -554 mV e para 2-nitroimidazóis o potencial de redução de um elétron fica entre -262 e -425 mV . Os 5-nitroimidazóis têm potenciais de redução compatíveis com o sistema redox de anaeróbios e são facilmente reduzidos por essas células, sem a competição com a presença de oxigênio. O substituinte no anel do nitroimidazol também é um dos fatores que determina o potencial de redução de um elétron para diferentes nitroimidazóis. Um substituinte doador de elétrons como o grupo metil no anel nitroimidazol é capaz de alterar o potencial de redução para valores mais negativos comparados com os potenciais dos nitroimidazóis análogos sem substituintes (VOOGD, 1989; EDWARDS, 1993; MORETH et al, 2010).

O grupo nitro é o responsável pela atividade contra o protozoário bem como pela atividade carcino-mutagênica, embora não esteja totalmente esclarecido o mecanismo de ação deste grupamento em relação à atividade tripanomicida (WALSH et al., 1987; SPERANDEO; BRIÑÓN; BRUN, 2004). No entanto, em contrapartida, este grupamento nitro é necessário para a atividade biológica desejada. A redução do grupo nitro acontece em etapas com transferência de um único elétron, sendo o ânion do nitro radical um intermediário da formação do nitroimidazol (EHLHARDT, BEAULIEU e GOLDMAN, 1988; MORETH et al., 2010).

A difícil correlação entre os resultados de mutagenicidade *in vitro*, em animais e em humanos, torna-se um fator limitante para o desenvolvimento de novos fármacos nitroimidazólicos; dessa forma, é de extrema importância que novos

estudos sejam realizados no sentido de elucidar a relação entre atividade biológica e mutagenicidade em humanos.

Com o objetivo de se determinar o mecanismo molecular de substâncias possuindo o grupo nitro, considerado essencial para o desenvolvimento de drogas contra doença de Chagas, foram estudados em paralelo os nitrofuranos e os nitroimidazóis. O megazol (MGZ) foi o mais ativo na série (MAYA et al., 2003).

1.5 MEGAZOL

O MGZ (figura 3) 2-amino-5(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)-1,3,4,tiadiazol foi sintetizado primeiramente por Asato e Berkelhammer em 1968 como um agente antimicrobiano, e foi identificado ativo contra espécies de *Trichomonas*, *Leishmania donovani*, e em 1980, pesquisadores brasileiros determinaram uma excelente atividade desta molécula contra o *Trypanosoma cruzi*, em ratos, por via oral (NESSLANY et al, 2004; NOVAES et al, 2011). O MGZ é um derivado nitroimidazólico que ainda não foi usado na prática clínica como medicamento para o tratamento das tripanossomíases, devido a sua genotoxicidade e efeitos carcinomutagênicos apesar de apresentar potente atividade tripanomicida (BARRET et al., 2000; POLI et al., 2002; ENANGA et al., 2003; NESSLANY et al, 2004; ARANTES, 2007; LIMA, 2011). A adição do sistema metabólico (sistema extrínseco de ativação metabólica como a fração S9), não modifica o efeito mutagênico do MGZ (FERREIRA & FERREIRA, 1986; POLI et al., 2002).

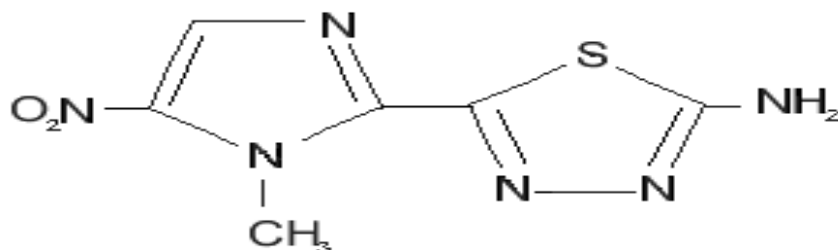


Figura 3 = Estrutura química do MGZ. . Fonte: TOXNET

Mostrou-se ativo contra *T. brucei gambiense* e várias cepas de *T. cruzi*, sendo eficaz em todas as fases da doença de Chagas, possuindo ação superior aos compostos NFT e BZN, quanto à utilização de menores doses, e atividade contra cepas resistentes de *T. cruzi* (ENANGA et al., 2003; MAYA et al., 2003). Embora o mecanismo subjacente ao efeito genotóxico e mutagênico do MGZ ainda não tenha sido esclarecido, uma das hipóteses para explicar a ação tripanomicida envolve a redução enzimática do grupamento nitro, gerando radicais livres que são altamente prejudiciais para as estruturas celulares (ENANGA et al., 2003; POÇA, 2005; OLIVEIRA et al., 2008; MITAL, 2009; MORETH et al, 2010). Substâncias heterocíclicas que apresentam grupamento nitro na estrutura molecular são usados há muitos anos como medicamentos antimicrobianos, antiparasitários e drogas radiosensibilizadoras. Por outro lado, a presença do grupamento nitro e sua localização na posição 5 do anel nitroimidazólico parece ser o responsável também pela toxicidade desta substância, incluindo o efeito mutagênico (DOBIÁS, et al, 1994; NESSLANY et al, 2004).

Relatos observados por Bouteille e seus colaboradores (1995) e também por Chauvière e colaboradores (2003), relataram que é possível curar camundongos infectados com o *T. brucei*, na fase aguda da doença, através da administração de uma única dose de MGZ. O MGZ mostrou-se altamente ativo *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi*, incluindo as cepas resistentes ao BZN, descrevendo o MGZ como sendo um limpador de tripanotiona, o co-fator para a tripanotiona redutase. E apesar do seu notável efeito tripanomicida, o desenvolvimento do MGZ foi interrompido devido a relatos de efeitos mutagênicos e genotóxicos *in vitro* (SALOMÃO et al., 2010). Por esse motivo, o interesse da Organização Mundial da Saúde (OMS) no desenvolvimento do MGZ como medicamento para a doença de Chagas sofreu duro golpe (LIMA, 2011).

Segundo estudos de Nessler e seus colaboradores (2004), o MGZ proveniente de lotes franceses e brasileiros, mostrou-se genotóxico direta e indiretamente em ensaios *in vitro* (com e sem ativação metabólica), fato este revelado pelo ensaio de micronúcleos em microescala com células de linfoma do rato e na análise de linfócitos humanos em metáfase. Também exibiu uma atividade genotóxica *in vivo* após a administração por via oral no ensaio de micronúcleo *in vivo* em medula óssea de ratos, e como consequência, pode ser considerado um carcinógeno humano.

Em modelos experimentais, com ou sem comprometimento cerebral, o MGZ mostrou-se eficaz mesmo quando administrado por curto período de tempo. Poucos foram os fármacos tripanomicidas já testados que exibiram atividade tão promissora para tratar esta grave condição que, se não for adequadamente tratada, inexoravelmente leva à morte do paciente (DIAS et al., 2009). Castro e Meirelles (1990) sugeriram ainda que o efeito antiparasitário do MGZ está relacionado a uma interferência com a síntese proteica das formas amastigotas. Mas autores sugerem, entretanto que este não seja o único mecanismo responsável pelo efeito mencionado. A atividade tripanomicida do MGZ envolve também o metabolismo do oxigênio, ou seja, o MGZ sofre dismutação originando uma espécie eletrofílica (forma nitrosa) que é sequestrador de tiol eficiente, principalmente para a tiol tripanotiona, co-fator para a destoxificação da tripanotiona redutase, enzima essencial para a sobrevivência do *T. cruzi* (MAYA et al, 2003).

Redutases presentes na fração microssomal do *T. cruzi* catalisam a redução do MGZ, dando origem ao radical nitro-ânion, interferindo com o metabolismo do oxigênio parasitário, o que induz a um estado de estresse oxidativo (VIODÉ et al, 1999).

A introdução de um fármaco com estrutura completamente nova no arsenal terapêutico envolve cerca de aproximadamente 20 anos e um custo de milhões de dólares (NOVAES et al, 2011). Este fato, agravado pela falta de investimentos de indústrias farmacêuticas em pesquisas envolvendo doenças negligenciadas, como a doença de Chagas, somado à ausência de tratamento eficaz para estas, resulta em consequências graves ao bem-estar da sociedade (WHO, 2016). Mediante ainda a essa realidade, cabe registrar importantes avanços ocorridos nos últimos anos através de redes de cooperação promovidas por organizações, como a DNDi. Estas iniciativas visam parcerias com o setor público ou privado para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos no combate às DTNs (MAGALHÃES; BOECHAT; ANTUNES, 2012).

1.5.1 Estudos farmacocinéticos com o MGZ

A farmacocinética do MGZ foi investigada após administração intraperitoneal (ip) e oral a camundongos na dose de 80 mg/kg. Os níveis plasmáticos foram significativamente mais altos após administração oral do que por via ip. A excreção do MGZ foi também avaliada após administração de MGZ tritado a ratos. Total radioatividade foi eliminada predominantemente pela via urinária (80%), versus 10,5% nas fezes, permanecendo 9,5% no organismo por 8 dias após a administração da dose (ENANGA et al, 1999).

O MGZ atravessa a barreira hemato-encefálica após administração oral de 100 mg/kg a seis primatas infectados com *Trypanosoma brucei gambiense*. Os níveis plasmáticos de MGZ ficaram entre 0,2 µg/mL e 46 µg/mL, 24 h após a dosagem. Em animais com infecção prolongada, a absorção de MGZ foi acelerada. As concentrações de MGZ no fluido cérebro-espinhal representaram entre 5,5% e 10,6% dos níveis plasmáticos nos mesmos tempos. O MGZ foi eliminado predominantemente pelos rins: 46-96% da dose ingerida foi recuperada na urina, comparada com 0-5% nas fezes(ENANGA et al., 2000).

Ovelhas experimentalmente infectadas com *T. brucei brucei* foram administradas oralmente com MGZ, em doses únicas de 40 ou 80 mg/kg. Concentrações plasmáticas de MGZ foram detectadas por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa 8h após tratamento destes animais estavam diminuídas sugerindo baixa absorção de MGZ em animais curados. Entretanto, os perfis plasmáticos de MGZ em ovelhas não infectadas após uma única dose oral de MGZ mostrou um rápido abaixamento de absorção associado com uma meia vida plasmática da droga. Variação das propriedades farmacocinéticas entre indivíduos foi também observada. Estas evidências sugerem que as altas taxas de falha do tratamento pelo MGZ estavam relacionadas à pequena disponibilidade da droga após administração oral em ovelhas. Concluiu-se que o MGZ podia curar ovelhas com infecção por *T.brucei*, porém a administração oral não foi uma via efetiva (BODA et al., 2004).

1.6 ASPECTOS REGULATÓRIOS

Entende-se, por vigilância sanitária, um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo: o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo; e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990). Neste sentido o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da FIOCRUZ tem como missão, contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária.

Como parte das ações da Vigilância Sanitária, no sentido de controlar bens de consumo que se relacionam com a saúde, como medicamentos, é essencial o estudo da genotoxicidade de substâncias principalmente as empregadas no tratamento de doenças negligenciadas no âmbito nacional. Trata-se de etapa essencial na avaliação pré-clínica de substâncias candidatas a medicamentos de acordo com o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, desenvolvido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A sua elaboração foi baseada em documentos de agências regulatórias internacionalmente reconhecidas e com atuação no sistema de vigilância sanitária de medicamentos como a *Food and Drug Administration (FDA)*, *European Medicines Agency (EMA)*, *International Conference on Harmonisation (ICH)*, *National Cancer Institute (NCI)* e a *World Health Organization (WHO)*, bem como a *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)*, visando uma maior harmonização com a regulamentação internacional (BRASIL, 2013).

O Guia estabelece as diretrizes para que os estudos pré-clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de novos medicamentos sejam realizados de forma harmonizada e cientificamente válida. Além disso, espera-se

que os estudos possam fornecer dados confiáveis para dar subsídios às futuras pesquisas clínicas.

Os testes de genotoxicidade de uma maneira geral devem ser capazes de detectar potenciais danos ao DNA tais como, mutações gênicas, mutações cromossômicas (alterações estruturais ou numéricas) ou mutações genômicas induzidas por substâncias químicas. Compostos que apresentam resultados “positivos” nos testes de genotoxicidade/mutagenicidade são potencialmente agentes carcinogênicos e/ou mutagênicos para seres humanos.

1.7 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

Os estudos de mutagenicidade referem-se às propriedades que as substâncias químicas apresentam de provocar modificações no material genético (DNA) das células, de modo que estas sejam transmitidas às novas células durante sua divisão celular. Dependendo da célula afetada, as mutações podem acarretar dano desde a célula de desenvolvimento inicial (célula ovo), podendo levar à morte do embrião ou feto até o desenvolvimento de anomalias congênitas que podem ser transmitidas hereditariamente (BARROS; DAVINO, 2008).

Vários testes *in vitro* e *in vivo* foram desenvolvidos para avaliar as propriedades mutagênicas das substâncias químicas. A principal finalidade da identificação destas propriedades reside na necessidade de se quantificar o perigo de lesão ao DNA e conseqüentemente a transmissão hereditária destas mutações. Esses testes são empregados também para prever o desenvolvimento de neoplasia maligna (câncer), pois a etapa inicial do processo de carcinogênese envolve mutação (BARROS; DAVINO, 2008). Adicionalmente, os estudos para avaliação de genotoxicidade, também são testes *in vitro* e *in vivo*, que são realizados para detectar o potencial das substâncias que estão sob investigação de causar possíveis mutações gênicas e cromossômicas (BRASIL, 2013). Os testes de carcinogenicidade *in vivo* devem ser realizados, principalmente nos casos em que ocorra exposição humana as substâncias químicas ocorrer a longo prazo.

De acordo com o Guia para Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao Desenvolvimento de

Medicamentos da Anvisa, há duas opções de baterias de testes que podem ser realizados nos estudos para avaliação de genotoxicidade (BRASIL, 2013).

Na opção 1, os seguintes testes são preconizados:

1- Um teste para mutação gênica em bactéria na presença e na ausência de ativação metabólica;

2- Um teste citogenético para avaliação de dano cromossômico (teste de aberrações cromossômicas *in vitro* ou teste de micronúcleo *in vitro*) ou um teste *in vitro* de mutação gênica em células de mamífero timidina kinase em células de linfoma de camundongo, na presença e na ausência de ativação metabólica;

3- Um teste *in vivo* para genotoxicidade, geralmente um teste de dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores (camundongos ou ratos), podendo ser ensaio de micronúcleos ou de aberrações cromossômicas. Para o teste de micronúcleos *in vivo* recomenda-se a utilização de roedores apenas de um sexo, de preferência machos, desde que haja dados que indiquem a não diferença de toxicidade entre os sexos. Quando substâncias sexo-específicas estão sendo testadas, o ensaio deverá ser realizado no sexo apropriado.

Na opção 2, os seguintes testes são recomendados:

1- Um teste para mutação gênica em bactéria, na presença e na ausência de ativação metabólica,

2- Uma avaliação de genotoxicidade *in vivo* em dois tecidos, geralmente um teste de micronúcleo em células hematopoiéticas de roedores e um segundo ensaio *in vivo*.

Para o teste de mutação gênica recomenda-se a utilização de linhagens de *Salmonella typhimurium* nas cepas TA1535, TA1537 (ou TA 97, ou TA97a), TA98 e TA100, bem como nas cepas TA 102, *Escherichia coli* WP2 uvrA ou *Escherichia coli* WP2 uvrA (pKM101) para detecção de mutações pontuais. Para avaliação do potencial de genotoxicidade podem ser utilizados os guias específicos Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review da OECD.

Os testes realizados para avaliação da genotoxicidade devem ser capazes de avaliar os potenciais danos ao DNA e a fixação do respectivo dano. Tais agravos ao DNA podem ser observados na forma de mutações gênicas, mutações cromossômicas estruturais e alterações cromossômicas numéricas e recombinação, que são essenciais na indução de efeitos hereditários e no processo de múltiplas etapas de malignização. Substâncias químicas que são positivas em testes que

detectam estes diferentes tipos de danos tem o potencial de serem carcinógenos humanos e/ou mutágenos, isto é, podem induzir câncer e/ou anomalias hereditárias. Devido a constatação de uma relação entre a exposição a agentes químicos e a carcinogênese em humanos, e a difícil relação entre a exposição e doenças hereditárias, os testes de genotoxicidade, têm sido utilizados principalmente, para a previsão de potencial carcinogênico (ICH, 1997; BRASIL, 2013).

Dentre os testes de genotoxicidade disponíveis para detecção de quebras de fitas de DNA, destaca-se o ensaio SCG (*Single Cell Gel*) ou Cometa sob condições alcalinas. Trata-se de uma técnica eletroforética que tem ampla aplicação na avaliação de genotoxicidade em células de mamífero *in vitro* e *in vivo*, sendo utilizado como instrumento de triagem para se avaliar o potencial mutagênico de substâncias químicas em geral e de drogas (HARTMANN; SPEIT, 1997). É uma técnica útil, reprodutível, simples e rápida, apresentando múltiplas aplicações para se estudar os danos e reparo ao DNA. Este ensaio combina a simplicidade de técnicas bioquímicas que detecta quebras de fita única (QFU) de DNA e/ou de lesões em sítios álcali-sensíveis e de QFU em sítios de reparo por excisão incompleta, em células de mamífero *in vitro* e *in vivo* (SPEIT; HARTMANN, 2006). Através desta técnica é possível a avaliação de dano e de reparo ao DNA em células proliferantes e não proliferantes em nível individual empregando-se amostras celulares extremamente pequenas (5 a 10 μ L). As células são embebidas em gel de agarose em lâmina para microscopia, posteriormente lisadas, e submetidas a eletroforese em condições alcalinas. As células que apresentam danos no DNA mostram migração aumentada de DNA cromossômico do núcleo em direção ao anodo, que se assemelha a forma de um cometa (com cabeça e cauda) e que, após coloração pelo brometo de etídio, são visualizados através de análise microscópica de fluorescência. A extensão da migração (cauda) do DNA em relação à cabeça reflete o número de quebras de DNA (COLINS, 2004).

Esse ensaio se apresenta vantajoso em relação aos demais, por se tratar de uma técnica simples e de rápida execução; por apresentar alta sensibilidade para a detecção de danos ao DNA em qualquer população de célula eucariótica, por permitir a análise do efeito em células individuais; e, finalmente, pela utilização amostras celulares extremamente pequenas (SPEIT; HARTMANN, 2006). O ensaio tem amplas aplicações em toxicologia genética, em testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (COLINS, 2004); no biomonitoramento ambiental e monitoramento

populacional humano (DUSINSKA; COLLINS, 2008). Também tem sido empregado com bons resultados, no estudo de células sanguíneas humanas, quanto a suscetibilidade à radiação e a substâncias químicas mutagênicas (VIJAYALAXMI et al, 1992); e quanto a avaliação de dano e reparo ao DNA associado com o câncer (MCKENNA et al, 2008).

O ensaio de MN é um teste de mutagenicidade que detecta micronúcleos no citoplasma de células interfásicas que se originam de fragmentos de cromossomos sem centrômeros ou acêntricos, de cromossomos ou de cromossomos inteiros que foram incapazes de migrar para os polos durante a fase de anáfase da divisão celular (OECD, 2010). O ensaio de MN é empregado como substituição ao teste de aberrações cromossômicas, para avaliar o potencial mutagênico de uma substância. O ensaio de MN tem sido apontado como um dos métodos preferidos para avaliar danos cromossômicos, pois permite que tanto as perdas de cromossomos (aneugenicidade), quanto às quebras cromossômicas (clastogenicidade), sejam detectadas de forma confiável. Na sua forma básica, o ensaio de MN possibilita várias determinações complementares de mutagenicidade, pois detecta quebras, perdas e rearranjos cromossômicos e avalia a citotoxicidade através da inibição da divisão celular, necrose e a apoptose celular (ICH, 1996; FENECH, 2000; OECD, 2010).

O ensaio de MN *in vitro* também pode ser utilizado para avaliar os danos genéticos na população, ou seja, no biomonitoramento das populações humanas, na determinação da sensibilidade à radiação para avaliação do risco de indução de câncer, na otimização da radioterapia. Tem aplicações em ecotoxicologia, e grande importância no teste de novos produtos farmacêuticos e agroquímicos, quanto ao potencial genotóxico (FENECH, 2000).

Na avaliação da genotoxicidade o ensaio de MN *in vitro* foi reconhecido no Brasil como método alternativo validado ao uso de animais em atividades de pesquisa do acordo com a resolução normativa nº 18 de 24 de setembro de 2014 do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BRASIL, 2014).

1.8 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

As pesquisas por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, e doença do sono têm evoluído nas últimas décadas, com destaque para a elucidação dos genomas do *T. cruzi* e *T. brucei*, que permitiu a identificação de vários genes, muitos deles existentes apenas no parasita e não no homem. O aumento considerável nos investimentos requeridos no desenvolvimento de novos fármacos, aliado à perspectiva de retornos financeiros, tem como resultado a quase inexistência de recursos por parte das principais companhias farmacêuticas e biotecnológicas do mundo, e segundo dados da DNDi, a doença de Chagas e do sono, estão entre as doenças “extremamente negligenciadas” (DIAS et al., 2009).

Estes dados só reforçam a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias profiláticas e terapêuticas, incluindo a identificação de novas drogas tripanomicidas e imunomoduladoras que proporcionem o controle do parasitismo e contribuam para a modulação da inflamação crônica não benéfica. Contudo, o repertório de fármacos disponíveis é limitado e inadequado, e o quadro é bastante agravado pela emergência de cepas de parasitas resistentes (DIAS et al., 2009).

Dentre os requerimentos estabelecidos pela OMS para bons candidatos a fármacos antichagásicos, estão: alta potência e seletividade contra as formas mamíferas do *T. cruzi*; eficácia em modelos experimentais agudos e crônicos da doença de Chagas; elevada biodisponibilidade em humanos; administração por via oral; uma única dose diária; tratamento em poucas doses; baixa toxicidade; segurança para administração em crianças e gestantes; princípio ativo com fabricação simples; e baixo custo. Uma das grandes dificuldades encontradas pelos pesquisadores na área de doença de Chagas está justamente na falta de padronização de protocolos experimentais e de cepas do *T. cruzi* para avaliação de substâncias com atividade antichagásica (ZINGALE et al. 2014). Este é um aspecto relevante, especialmente na área de doenças negligenciadas, onde existe uma necessidade premente de ações globais capazes de promover maiores avanços das pesquisas (DIAS et al., 2009).

A constatação do efeito clastogênico/mutagênico e/ou genotóxico de uma substância química, via de regra, é um sério obstáculo para a continuidade do desenvolvimento do medicamento devido aos riscos associados à carcinogênese e

ao processo reprodutivo. A decisão de continuar ou não o desenvolvimento do fármaco depende, entretanto da ponderação risco x benefício que leva em conta a severidade da condição a ser tratada e a existência de alternativas. Assim sendo, há casos em que a constatação de mutagenicidade não impede o desenvolvimento posterior do medicamento como ocorre, por exemplo, com os antineoplásicos existentes no mercado que, em grande parte, são substâncias antimetabólicas com reconhecida ação genotóxica. Nesses casos não há outras formas eficazes de tratamento e a severidade a curto prazo da doença justifica os riscos a longo prazo associados (COLLINS, 2004).

O Departamento de Síntese de Fármacos do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) da FIOCRUZ, sob a coordenação da Dra. Núbia Boechat, vem desenvolvendo projetos de novas moléculas com possível atividade tripanomicida utilizando estratégias de planejamento racional de fármacos análogos do MGZ (1) para o tratamento da doença de Chagas (BOECHAT et al., 2006) com o intuito de se obter substâncias com mesmo perfil farmacodinâmico do MGZ, porém com menor incidência de efeitos colaterais e ausência de mutagenicidade.

Sete substâncias nitroimidazólicas análogas do MGZ sabidamente eficazes foram propostas, utilizando como ferramenta o bioisosterismo, como ilustra a Figura 4:

- A substância **2** foi eleita empregando o bioisosterismo entre anéis, onde observa a substituição do núcleo tiazólico presente no MGZ (**1**) para o núcleo triazólico presente no análogo **2**, para avaliar como essa nova substância se comportará contra o parasita, já que é conhecida a boa atividade tripanomicida do núcleo triazólico;
- A substância **3** foi proposta utilizando o bioisosterismo entre anéis com análogo de posição, substituindo o núcleo do C-2 para o C-5, acrescido do NH como grupo espaçador, para avaliar a importância da posição destes grupos no sistema nitroimidazólico frente a atividade tripanomicida;
- A substância **4** foi estudada pelo fato de ser observado o desaparecimento da atividade mutagênica, quando o grupo nitro foi transferido da posição 5 do anel imidazólico da substância **1** para a posição 4 da substância **4** e a inserção de um grupamento a posição α ao grupo nitro, sem prejuízo da atividade tripanomicida;

- Foi realizado um bioisosterismo de anel para a obtenção das substâncias **5**, **6**, **7** e **8** com o anel imidazólico, 1,2,4-triazol e 1,2,3-triazol-4-substituído, obedecendo os pré-requisitos estruturais de posição da substância 4.

Dentre estas substâncias planejadas e sintetizadas, os nitroimidazólicos **2**, **3** e **4** já foram avaliados contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e apresentaram uma boa atividade biológica. Os **3** e **4** erradicaram o parasita nas concentrações 0,3 mg/mL e 2,5 mg/mL respectivamente (BOECHAT et al., 2001), e o **2** apresentou uma concentração inibitória média (IC₅₀) de 522,4 µM (CARVALHO et al., 2007). Valor de IC₅₀ = 256.8 ± 53.0 µM para a substância 2 foi obtido para *T. cruzi* e de IC₅₀ > 40µM obtido para *T. brucei* (CARVALHO et al., 2014).

Os ensaios de genotoxicidade das substâncias acima, sintetizadas por Farmanguinhos, serão realizados no Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do INCQS através da parceria técnico-científica INCQS-Farmanguinhos. O objetivo desse estudo foi avaliar se o efeito genotóxico e citotóxico foi abolido nesses nitroimidazólicos (**2-8**) empregando-se o ensaio Cometa e o ensaio de micronúcleo em células sanguíneas humanas *in vitro*.

O ensaio de micronúcleo (MN) *in vitro* detecta micronúcleos no citoplasma de células interfásicas que se originam de fragmentos acêntricos de cromossomos ou de cromossomos inteiros que foram incapazes de migrar durante a anáfase. É considerado um ensaio de genotoxicidade/mutagenicidade confiável e relevante para medicamentos sendo recomendado como uma alternativa ao teste de aberração cromossômica estrutural *in vitro* e/ou ao ensaio de linfoma em camundongos (LYNCH et al., 2011). A diretriz da OECD 487 para a condução do ensaio para fins regulatórios foi aprovada em julho de 2010 (OECD, 2014).

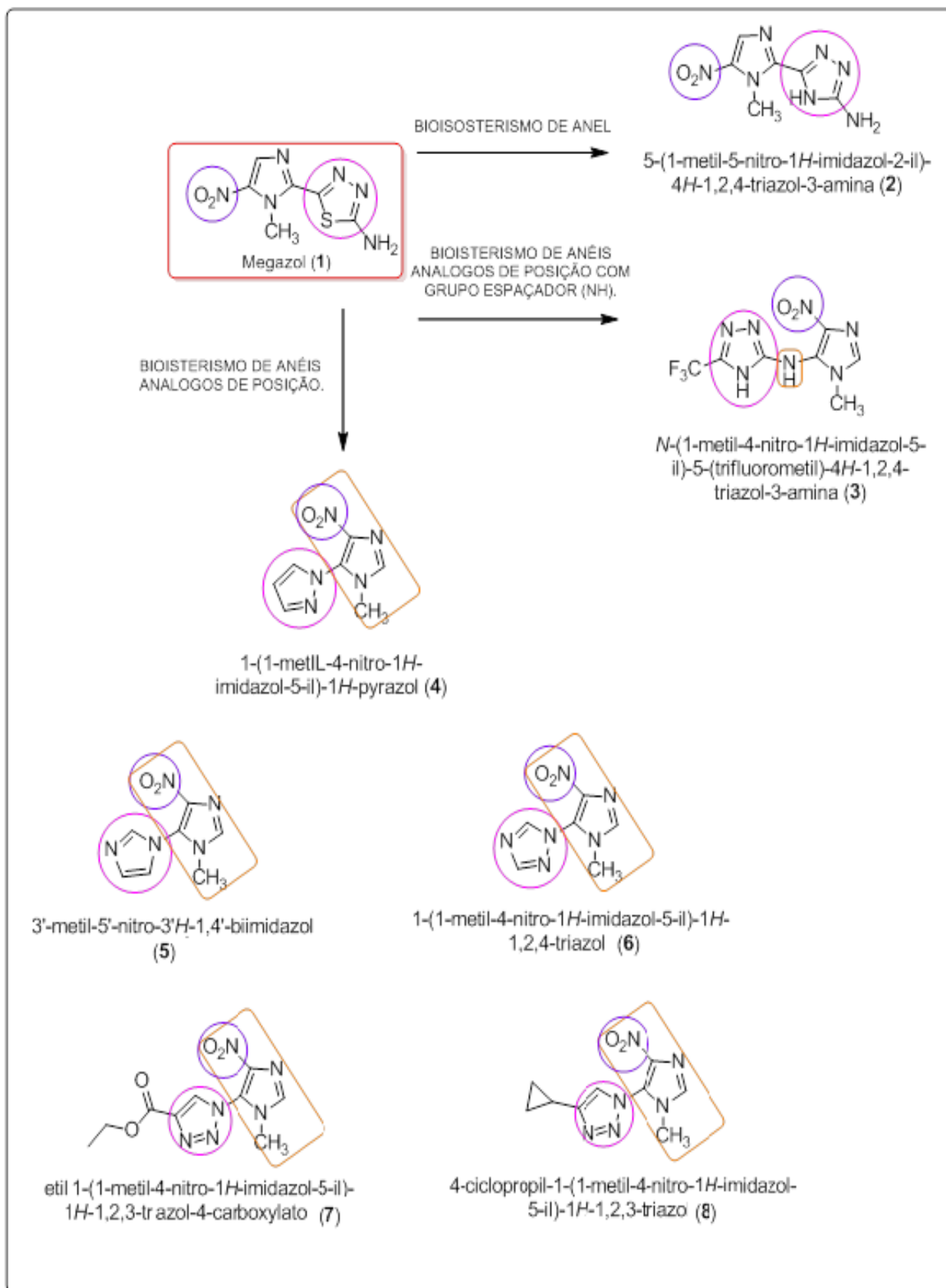


Figura 4: Planejamento racional de análogos do megazol: estrutura química dos compostos nitroimidazólicos (1-8).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

➤ Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* do MGZ (1) e das sete substâncias nitroimidazólicas análogas do MGZ (2-8) em células sanguíneas humanas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o ensaio de citotoxicidade *in vitro* mediado pelo brometo de etídio e diacetato de fluoresceína em células sanguíneas humanas das 8 substâncias nitroimidazólicas;
- Realizar o ensaio Cometa *in vitro* em células sanguíneas humanas das 8 substâncias nitroimidazólicas;
- Realizar o ensaio de MN das 8 substâncias nitroimidazólicas em células sanguíneas humanas *in vitro*;
- Mapear a atividade genotóxica das substâncias nitroimidazólicas análogas do MGZ de acordo com o planejamento racional proposto;
- Estabelecer a possível relação estrutura – atividade genotóxica.

3 METODOLOGIA

O ensaio Cometa em células sanguíneas humanas *in vitro* sob condições alcalinas foi realizado de acordo com o Procedimento Operacional Padronizado (POP/INCQS) nº 65.3330.011 (2015) referente ao ensaio Cometa (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2015) baseado nas diretrizes estabelecidas por SPEIT; HARTMANN, (2006) e por TICE e colaboradores (2000).

O ensaio de MN *in vitro* em células humanas sanguíneas foi realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento da Economia (OECD) 487 (*In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*).

O sangue total humano heparinizado (400 UI de heparina/mL) foi obtido por punção venosa imediatamente antes dos ensaios. O sangue foi obtido de voluntários saudáveis, jovens (24-35 anos) não fumantes, sem recente exposição a substâncias químicas genotóxicas ou à radiação (raios X) nos três meses anteriores à coleta, foi obtido por punção venosa imediatamente antes dos ensaios.

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) sob o nº CAAE: 41684815.3.0000.5248 (Anexo 1). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos voluntários doadores e o Questionário para participação como doador para o ensaio Cometa e o ensaio de Micronúcleo encontram-se nos Apêndices A e B.

3.1 ENSAIO COMETA

3.1.1 Ensaio prévio de citotoxicidade mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio

Para a seleção da faixa de concentrações a ser testada no ensaio Cometa, efetuamos inicialmente, um ensaio de citotoxicidade para determinação da viabilidade de células sanguíneas após tratamento com as substâncias 1 (MGZ), 3, 6

e 8: 149-10.000 μM ou com cada uma das outras quatro substâncias nitroimidazólicas análogas do MGZ (substâncias 2, 4, 5 e 7): 149 a 6.400 μM em dimetilsulfóxido 5% v/v (DMSO-Sigma), com o controle-solvente (DMSO 5% v/v) e com o controle sem tratamento (controle celular) durante 2 h a 37°C em estufa de cultura (Sanyo). A concentração de 10.000 μM corresponde à concentração máxima a ser testada para compostos relativamente não citotóxicos (TICE et al., 2000). Por não se dispor de quantidade suficiente para se testar a concentração de 10.000 μM , para as substâncias 2, 4, 5 e 7 foi testada 6.400 μM como a concentração máxima.

O sangue total heparinizado foi colocado em microtubos plásticos de 0,6 mL com tampa achatada e o tratamento realizado em duplicata de acordo com o seguinte protocolo:

1. Controle celular: Sem tratamento com 300 μL de sangue
2. Controle-solvente: Adição de 15 μL de DMSO em 285 μL de suspensão celular: concentração final: DMSO 5%. Período de tratamento: 2h.
3. Substâncias teste nitroimidazólicas (2, 4, 5 e 7) foram tratadas com 9 concentrações de cada uma das substâncias-teste (149 μM a 6.400 μM) e as substâncias (1, 3, 6 e 8) foram tratadas com 10 concentrações de cada uma das substâncias-teste (149 μM a 10.000 μM) em DMSO 5%. Período de tratamento: 2h.
 - Adição de 15 μL de solução-teste (2.980 μM) em DMSO a 285 μL de suspensão celular: concentração final: 149 μM (1-8) em DMSO 5%
 - Adição de 15 μL de solução-teste (4.760 μM) em DMSO a 285 μL de suspensão celular: concentração final: 238 μM (1-8) em DMSO 5%
 - Adição de 15 μL de solução-teste (7.640 μM) em DMSO a 285 μL de suspensão celular: concentração final: 382 μM (1-8) em DMSO 5%
 - Adição de 15 μL de solução-teste (12.200 μM) em DMSO a 285 μL de suspensão celular: concentração final: 610 μM (1-8) em DMSO 5%
 - Adição de 15 μL de solução-teste (19.540 μM) em DMSO a 285 μL de suspensão celular: concentração final: 977 μM (1-8) em DMSO 5%
 - Adição de 15 μL de solução-teste (31.240 μM) em DMSO a 285 μL de suspensão celular: concentração final: 1.562 μM (1-8) em DMSO 5%
 - Adição de 15 μL de solução-teste (50.000 μM) em DMSO a 285 μL de suspensão celular: concentração final: 2.500 μM (1-8) em DMSO 5%

- Adição de 15 µL de solução-teste (80.000 µM) em DMSO a 285 µL de suspensão celular: concentração final: 4.000 µM (1-8) em DMSO 5%
- Adição de 15 µL de solução-teste (128.000 µM) em DMSO a 285 µL de suspensão celular: concentração final: 6.400 µM (2, 4, 5 e 7) em DMSO 5%
- Adição de 15 µL de solução-teste (200.000 µM) em DMSO a 285 µL de suspensão celular: concentração final: 10.000 µM (1, 3, 6 e 8) em DMSO 5%

Após o período de tratamento, determinou-se a viabilidade celular empregando-se o ensaio com diacetato de fluoresceína (DAF) e brometo de etídio (BrEt) segundo HARTMANN; SPEIT (1997). O sangue total (50 µL) foi misturado com igual volume de solução de corante, que consistia de 30 µg/mL de DAF (Sigma) e 8 µg/mL de BrEt (Sigma) em salina tamponada de fosfato (PBS). As amostras (50 µL) foram colocadas em lâminas de microscopia que foram cobertas com lamínulas. Células viáveis mostram fluorescência verde, enquanto núcleos corados em laranja indicam células mortas. O total de duzentas células foram analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon) para cada tratamento a um aumento de 400X. Os resultados foram expressos em percentual de decréscimo de viabilidade celular ou percentual de citotoxicidade. Devemos evitar no ensaio Cometa concentrações que determinem valores superiores a 30% de decréscimo de viabilidade celular quando comparadas às culturas controle-solvente (DMSO 5%).

3.1.2 Ensaio Cometa

Nas mesmas condições de cultura descritas para o ensaio de citotoxicidade, foram realizados dois ensaios Cometa com cada uma das seis substâncias nitroimidazólicas (2, 3, 4, 5, 6 e 8) e três ensaios com as substâncias 1 (MGZ) e 7 nas mesmas condições de diluições descritas para o ensaio de citotoxicidade. As células sanguíneas humanas foram tratadas em duplicata durante 2 h a 37°C, com cada substância-teste (1-8) nas mesmas concentrações em DMSO 5%, como indicado em 3.1.1, com DMSO 5% ou com o controle positivo metanosulfonato de metila (MMS: Aldrich) 160 µM. O protocolo experimental de tratamento do sangue total foi idêntico ao descrito em 3.1.1, acrescido do controle positivo MMS 160 µM. Neste grupo

experimental 50 μL de solução 0,8 mM de MMS em PBS foi adicionado a 200 μL de sangue (2 microtubos) resultando na concentração final de 0,16 mM ou 160 μM de MMS.

Após o tratamento de 2h, as culturas foram removidas da estufa e, em seguida, aliquotas de 5 μL da mistura de incubação foram misturadas com 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (agarose de BPF-Sigma-Aldrich) 0,5% m/v em PBS a 37°C, e adicionada a lâminas de microscópio, com uma das extremidades fosca, previamente revestidas pela agarose de ponto de fusão normal 1,5% m/v (Sigma-Aldrich) em PBS. Quatro lâminas por tratamento e por experimento foram preparadas (duas lâminas por cultura). Imediatamente após, as lâminas foram cobertas com uma lamínula e mantidas em geladeira (6 a 8°C) por cerca de 5 min para solidificar a agarose de BPF. Após a solidificação da agarose de BPF, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas mergulhadas na solução de lise (sarcosinato de lauroilo sódico 1%, m/v, NaCl 2,5 M, EDTA dissódico 100 mM, Tris 10 mM, pH 10 e Triton X-100 1 % v/v) que foram mantidas *overnight* e protegidas da luz, em geladeira para lisar as células e permitir o desdobramento do DNA. As lâminas foram então removidas da solução de lise e colocadas em cuba de eletroforese horizontal (BIO-RAD) contendo solução tampão alcalina para eletroforese em pH >13 (EDTA dissódico 1 mM e NaOH 300 mM). As lâminas foram mantidas em solução tampão alcalina para eletroforese por 20 min em banho de gelo, para permitir o desdobramento do DNA e expressão dos sítios álcali-lábeis antes da eletroforese. Em seguida, a eletroforese foi realizada durante 20 min aplicando-se uma corrente elétrica de 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas pela lavagem por três vezes (5 min por lavagem) com solução Tris 0,4 M, pH 7,5, drenadas, fixadas em etanol absoluto (99,8% v/v) por cerca de 10 min e secas à temperatura ambiente *overnight*. BrEt (30 μL de uma solução 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi então adicionado a cada lâmina. A lâmina foi então coberta com uma lamínula e analisada usando microscópio de fluorescência (Nikon) ao aumento de 400X. Cinquenta células, selecionadas ao acaso por lâmina (200 células por tratamento), foram analisadas visualmente (figura 2) (CARVALHO et al., 2013; CARVALHO et al., 2014; BERGSTEN-TORRALBA et al, 2016). A análise microscópica foi efetuada avaliando-se a extensão de migração do DNA em 100 células (2 lâminas) por cultura, de acordo com o tamanho da cauda dos cometas em 4 diferentes classes (0 a 3), da seguinte forma:

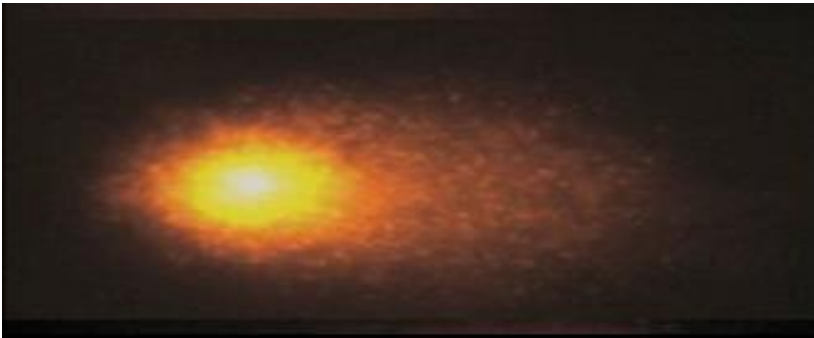
- classe 0: ausência de cauda;



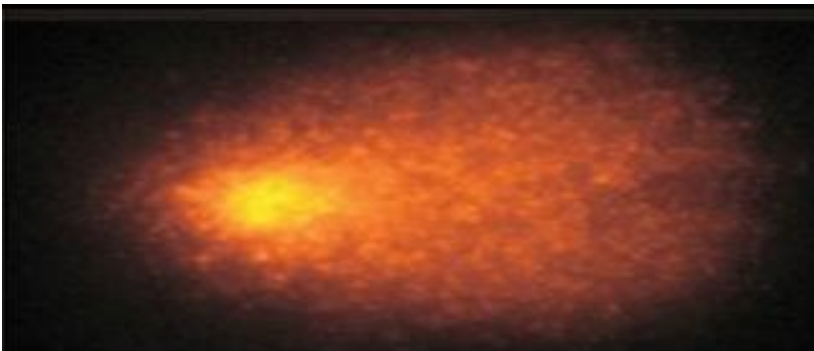
- classe 1: pequena cauda;



- classe 2: grande cauda;



- classe 3: totalmente danificado (cabeça do cometa muito pequena com praticamente todo o DNA na cauda).



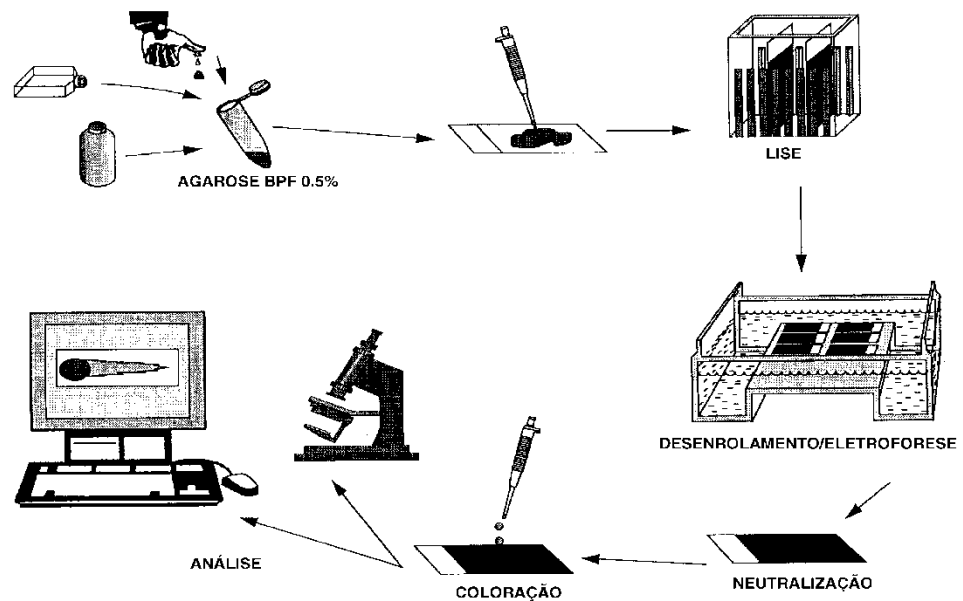


Figura 5: Esquema da realização das etapas do ensaio Cometa (Procedimento Operacional Padronizado (POP/INCQS) nº 65.3330.011 (2015) baseado nas diretrizes estabelecidas por SPEIT; HARTMANN, (2006) e por TICE e colaboradores (2000).

O dano ao DNA foi expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de unidades arbitrárias (UA), de acordo com a seguinte fórmula:

$$UA = [(M_0 \times 0) + (M_1 \times 1) + (M_2 \times 2) + (M_3 \times 3)]$$

M_0 = Número de células com classe de dano 0

M_1 = Número de células com classe de dano 1

M_2 = Número de células com classe de dano 2

M_3 = Número de células com classe de dano 3

O escore total de dano ao DNA em UA totais (UAT) para 200 células por experimento pode variar de 0 UAT (ausência de dano) a 600 UAT (máximo dano).

Ao se combinar os resultados dos ensaios Cometa independentemente realizados para cada uma das substâncias testadas (1-8), expressou-se o dano ao DNA como média e erro padrão da média (EPM) de UAT para as diferentes concentrações das substâncias-teste e para os controles negativos (DMSO 5% e controle) e controle positivo (MMS 160 μ M).

3.1.3 Análise estatística

Inicialmente foram testadas por experimento, as diferenças entre os valores médios de UAT obtidos para o grupo controle (DMSO 5%) e para cada concentração da substância-teste e para o controle positivo (MMS 160 μ M) em relação ao controle nas duas culturas em replicata por grupo experimental, empregando-se o teste *t* de Student de dados agrupados monocaudal aos níveis de significância de $\alpha= 0,05$ e $\alpha= 0,01$ (CARVALHO et al., 2014).

Para a conclusão final quanto à genotoxicidade de cada substância em células sanguíneas humanas *in vitro* foram testadas as diferenças entre os valores médios de UAT obtidos para os grupos controle (DMSO 5%) e para cada concentração das substâncias-teste nos dois ou três experimentos independentes efetuados empregando-se a mesma metodologia estatística mencionada anteriormente. A substância é considerada positiva ou genotóxica no ensaio Cometa, quando o aumento na migração do DNA estiver relacionado à concentração e na ocorrência de um correspondente aumento significativo ($p < 0,05$) em uma ou mais concentrações da substância- teste em relação ao controle-solvente DMSO 5% (TICE et al., 2000). Esta substância é então capaz de induzir quebra de fita de DNA em células sanguíneas humanas (linfócitos) *in vitro* nas condições experimentais descritas em 3.1.2. Quando nenhuma das concentrações-teste mostrar aumento estatisticamente significativo de migração de DNA em relação ao controle negativo, a substância é considerada negativa e então incapaz de induzir quebra de fita de DNA de linfócitos humanos nas condições experimentais do ensaio Cometa realizado.

3.2 ENSAIO DE MICRONÚCLEO *in vitro* EM CÉLULAS SANGUÍNEAS

3.2.1 Estabelecimento e tratamento das culturas de células sanguíneas humanas

As culturas primárias de células de sangue humano foram estabelecidas em tubos plásticos de cultura (Nunc) adicionando-se 0,5 mL de sangue total heparinizado a 4,5 mL de meio de cultura RPMI 1640, pré-aquecido a 37°C, com 2,0

mM de L-glutamina e 25 mM de HEPES (Gibco 23400-021), com adição de 2 g/L de bicarbonato de sódio e suplementado com 20% de soro fetal bovino, penicilina G potássica (10^2 UI/mL), sulfato de estreptomicina (10^2 µg/mL) e 3% v/v de fitohemaglutinina M (FHA-M: Gibco: 10576-015). Em seguida, as culturas em tubos com tampa em meia rosca foram mantidas em estufa (Sanyo) a 37° C e em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ durante 44h.

Ao final do período de incubação de 44h, procedeu-se ao tratamento das culturas com as substâncias-teste (1 a 8) solubilizadas em DMSO (Sigma), na faixa de concentrações de 150 a 10.000 µM, com o controle-solvente (DMSO 5%) e com os controles positivos, ou seja, com as soluções aquosas de mitomicina C (MMC: Mitocin-Bristol) nas concentrações finais de 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL e de Colcemid, derivado sintético da colchicina, N-desacetil-N-metilcolchicina (COL: Sigma) na concentração final de 0,02 µg/mL. A MMC, substância clastogênica direta e a COL, substância aneugênica são recomendadas como controles positivos no ensaio de MN *in vitro* pela diretriz TG 487 da OECD (OECD, 2014). O controle negativo (controle celular) correspondente à cultura sem tratamento foi empregado como cultura controle para MMC e COL.

Após a retirada da estufa, todos os tubos contendo a suspensão celular foram homogeneizados e o tratamento de cada uma das culturas (uma cultura por tratamento ou grupo experimental) foi realizado de acordo com o protocolo experimental abaixo:

4. Controle celular: Sem tratamento
5. Controle-solvente: Adição de 250 µL de DMSO à suspensão celular: concentração final: 5% de DMSO. Período de tratamento: 4h.
6. Substâncias teste nitroimidazólicas (1-8): Cinco culturas por ensaio foram tratadas com 5 concentrações de cada uma das substâncias-teste (150 a 10.000 µM) em DMSO 5%. Período de tratamento: 4h.
 - Adição de 250 µL de solução-teste (3.000 µM) em DMSO à suspensão celular: concentração final: 150 µM (1-8) em DMSO 5%
 - Adição de 250 µL de solução-teste (12.800 µM) em DMSO à suspensão celular: concentração final: 640 µM (1-8) em DMSO 5%
 - Adição de 250 µL de solução-teste (32.000 µM) em DMSO à suspensão celular: concentração final: 1.600 µM (1-8) em DMSO 5%

- Adição de 250 μL de solução-teste (80.000 μM) em DMSO à suspensão celular: concentração final: 4000 μM (1-8) em DMSO 5%
 - Adição de 250 μL de solução-teste (200.000 μM) em DMSO: concentração final: 10,000 μM (1-8) em DMSO 5%.
7. Controle positivo (MMC): Duas culturas por ensaio foram tratadas com 2 concentrações de MMC (0,5 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Período de tratamento: 2h.
- Adição de 100 μL de solução aquosa de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MMC à suspensão celular: concentração final 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
 - Adição de 100 μL de solução aquosa de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MMC à suspensão celular: concentração final 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
8. Controle positivo (COL): Uma cultura por ensaio foi tratada com COL 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Adição de 100 μL de solução aquosa de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de COL à suspensão celular: concentração final 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Período de tratamento: 28h

Durante o período de tratamento, todas as culturas foram mantidas em estufa nas mesmas condições experimentais descritas no estabelecimento das culturas.

Ao final do período de tratamento, todas as culturas foram retiradas da estufa, centrifugadas (900 rpm) durante 10 min, o sobrenadante foi removido e, em seguida, o *pellet* de células foi suspenso com 5 mL de solução de PBS. Após uma segunda centrifugação (900 rpm) durante 10 min, o sobrenadante foi removido e o *pellet* de células, foi ressuspenso com 5 mL de meio RPMI 1640 completo, como descrito acima, porém sem a FHA-M, mas adicionado de 7,5 μL de solução de 3 mg/mL de citocalasina B (CCB: Sigma C6762) por 5 mL de suspensão celular resultando na concentração final de 4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CCB. Em seguida as culturas retornaram à estufa até se completar o tempo total de cultura de 72h. A CCB inibe a polimerização da actina e possui atividade bloqueadora da citocinese levando à formação de células binucleadas. A adição de CCB às culturas permite a identificação e a análise de micronúcleos somente em células que completaram uma mitose (FENECH; MORLEY, 1985; KIRSCH-VOLDERS et al, 2000).

3.2.2 Processamento das células e preparação das lâminas

Ao final do período de 72 h de cultura, as células foram processadas de acordo com o procedimento a seguir. As culturas celulares foram centrifugadas a 900 rpm por 10 min. O sobrenadante foi removido deixando cerca de 500 µL no tubo. O *pellet* foi cuidadosamente ressuspenso e coletado em pipeta Pasteur acoplado ao bulbo de borracha. A cada tubo de cultura foi adicionado 5 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio 0,56%, previamente resfriada em geladeira por 10 min, seguida de suave homogeneização da suspensão celular empregando-se pipeta Pasteur e imediata centrifugação a 900 rpm por 10 min. Novamente, o sobrenadante foi removido e cerca de 500 µL da suspensão foi cuidadosamente ressuspensa e coletada em pipeta Pasteur. Cinco mililitros de solução fixadora (metanol/ácido acético glacial 5:1, previamente mantida a -20⁰ C e misturada com igual volume de cloreto de sódio 0,9%) foram adicionados a cada tubo e após suave homogeneização com a suspensão celular utilizando pipeta Pasteur foram mantidos por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, outra centrifugação realizada (900 rpm) durante 10 min, remoção de sobrenadante deixando 500 µL e em seguida, fixação das células com a adição de 5 mL de solução metanol/ácido acético glacial (5:1, -20⁰ C) por 15 min à temperatura ambiente. Esta etapa de fixação foi repetida duas vezes. Após a terceira fixação, centrifugou-se, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 5 mL de solução metanol/ácido acético glacial (5:1, -20⁰ C) e, em seguida, as suspensões celulares fixadas foram mantidas em geladeira (4 a 6°C) até a preparação das lâminas.

Anteriormente ao preparo das lâminas, centrifugou-se a suspensão celular fixada, removeu-se o sobrenadante e suspendeu-se o *pellet* celular com cerca de 1mL de solução metanol/ácido acético glacial (5:1, -20⁰ C). Em seguida aplicou-se com pipeta Pasteur a suspensão celular fixada em lâmina de microscopia com uma extremidade fosca. As lâminas foram colocadas sobre uma placa quente (60⁰ C) para secagem ao ar e para se obter células com um citoplasma volumoso. As lâminas foram confeccionadas no momento da avaliação microscópica.

3.2.3 Análise microscópica

Para avaliação microscópica, as lâminas secas ao ar foram coradas por três segundos com solução corante de laranja de acridina (60 µg/mL) em tampão Sörensen (0,03 M KH_2PO_4 e 0,03 M Na_2HPO_4). As lâminas foram enxaguadas em água destilada e depois cobertas por uma lamínula. Ao microscópio de fluorescência o DNA dos núcleos principais e dos MNs corados pela laranja de acridina mostram fluorescência verde (HAYASHI; SOFUNI; ISHIDATE, 1983). A análise foi efetuada em microscópio de fluorescência (aumento de 400X), quanto à presença de MNs por 2000 células binucleadas selecionadas ao acaso por cultura ou grupo experimental.

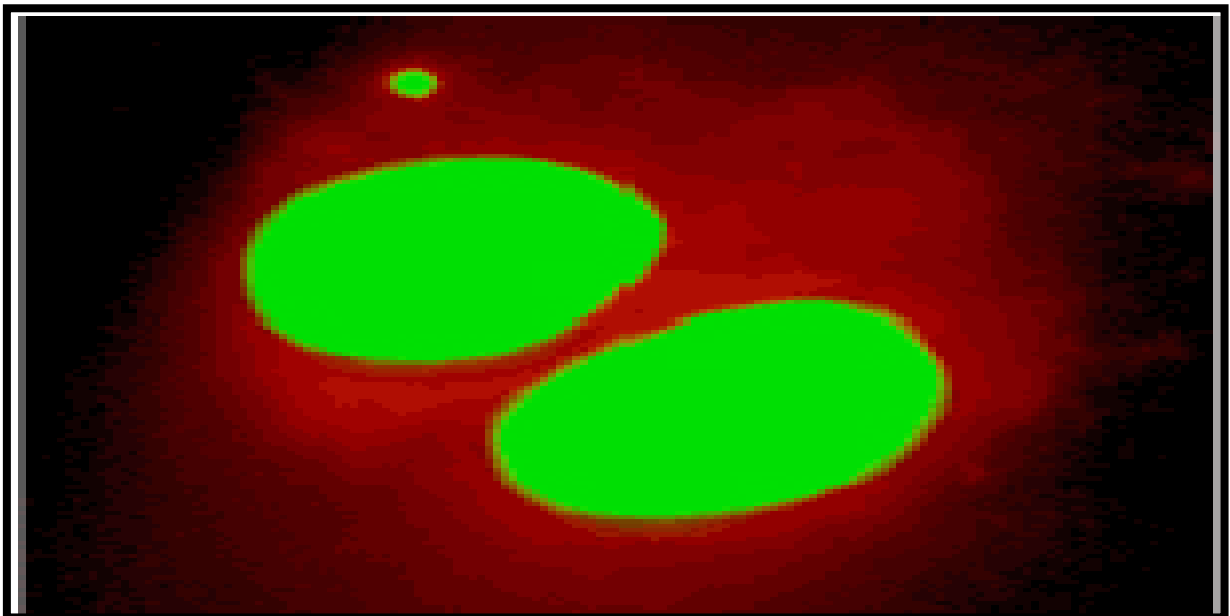


Figura 6: Célula binucleada de linfócito humano com a presença de um micronúcleo no citoplasma. Coloração pela laranja de acridina. Aumento de 400 x. Fonte: Foto da própria autora.

No caso específico do ensaio com a COL, foram analisadas por cultura ou grupo experimental, a presença de MNs em 2000 células binucleadas e em 2000 células mononucleadas, pois de acordo com SPEIT e colaboradores (2011), COL aumentou mais acentuadamente a indução de MNs em células mononucleadas do que em células binucleadas.

Para todos os grupos experimentais, o resultado foi expresso como o número de células binucleadas com MN no total de 2000 células binucleadas analisadas por

cultura e no ensaio com a COL, adicionalmente o resultado incluiu a expressão do número de células mononucleadas com MN no total de 2000 células mononucleadas analisadas por cultura.

Simultaneamente ao ensaio de MN na presença de CCB, dois métodos foram empregados para a medida de citotoxicidade (OECD, 2014). O primeiro método baseia-se na determinação do índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese (IPBC) e o segundo método consiste na determinação do índice de replicação (IR). Para a determinação dos dois índices foram analisadas 500 células por cultura. A citotoxicidade foi evidenciada na ocorrência de redução no IPBC ou no IR das culturas tratadas pelas substâncias-teste quando comparado às culturas controles (OECD, 2014). A medida da citotoxicidade foi empregada para a seleção das concentrações da substância-teste a serem analisadas quanto à presença de MNs. A concentração máxima empregada na análise de MNs foi a que induziu 45 ± 5 % de redução de IPBC ou de IR quando comparada ao controle negativo concorrente (OECD, 2014).

O IPBC indica o número médio de núcleos por célula. O IPBC foi determinado em culturas tratadas (IPBC_T) e em culturas controle concorrentes (IPBC_C) e foi usado para se calcular a proliferação celular e o percentual de inibição do crescimento celular (% de atividade citostática) induzido pelo tratamento (LORGE et al., 2008). Para a determinação do IPBC, 500 células por cultura foram analisadas quanto à incidência de células mononucleadas, células binucleadas e células multinucleadas. O IPBC e o % de atividade citostática foram calculados de acordo as fórmulas (1) e (2) a seguir:

$$(1) \text{ IPBC} = \frac{(\text{N}^\circ \text{de células mononucleadas}) + 2(\text{N}^\circ \text{de células binucleadas}) + 3(\text{N}^\circ \text{de células multinucleadas})}{\text{Número total de células}}$$

$$(2) \text{ Atividade citostática (\%)} = 100 - 100 [(\text{IPBC}_T - 1) / (\text{IPBC}_C - 1)]$$

T = culturas tratadas com substância-teste

C = culturas controle

O IR indica o número relativo de ciclos celulares por célula durante o período de exposição à CCB em culturas tratadas comparado às culturas controle e foi usado para se calcular o % de atividade citostática relativo ao IR. Para a

determinação do IR foram analisadas 500 células por cultura quanto à incidência de células binucleadas e células multinucleadas. O IR e o % de atividade citostática foram calculados de acordo com as fórmulas (3) e (4) a seguir:

$$(3) \text{ IR} = \frac{(\text{N}^\circ \text{de células binucleadas}) + 2(\text{N}^\circ \text{de células multinucleadas})}{(\text{número total de células})_T} \\ \frac{(\text{N}^\circ \text{de células binucleadas}) + 2(\text{N}^\circ \text{de células multinucleadas})}{(\text{número total de células})_C}$$

T = culturas tratadas com substância-teste

C = culturas controle

$$(4) \text{ Atividade citostática (\%)} = 100 - \text{IR}$$

3.2.4 Critérios para a seleção das células binucleadas no ensaio de MN pelo bloqueio da citocinese

A seguir, as características que devem apresentar as células binucleadas para serem analisadas quanto à presença de MNs (FENECH, 2000):

- Os núcleos devem ser semelhantemente redondos ou ovais
- Os dois núcleos na célula binucleada devem ter membranas nucleares intactas e estarem dentro do mesmo limite citoplasmático
- Os dois núcleos numa célula binucleada devem ter aproximadamente o mesmo tamanho.
- Os dois núcleos numa célula binucleada podem estar ligados por uma fina ponte nucleoplasmática, que não seja mais larga do que $\frac{1}{4}$ do diâmetro nuclear.
- Os dois núcleos principais na célula binucleada podem se tocar, mas, idealmente não devem se sobrepor. Uma célula com dois núcleos sobrepostos pode ser analisada somente se os limites (membranas) de cada núcleo forem distinguíveis.
- O limite citoplasmático ou a membrana de uma célula binucleada deve estar intacta e claramente distinguível do limite citoplasmático das células adjacentes.

3.2.5 Critérios para análise de MNs no ensaio de MN pelo bloqueio da citocinese (FENECH, 2000):

- As células devem ter uma aparência redonda ou oval com um citoplasma intacto.
- MNs são morfológicamente idênticos, mas menores que os núcleos
- MNs devem ser contados somente se tiverem diâmetros menores do que os núcleos principais (cerca de 1/16 a 1/3 em linfócitos humanos).
- MNs não são refringentes podendo ser facilmente distinguíveis de artefatos, como por exemplo, de partículas coradas.
- MNs não são ligados ou conectados aos núcleos principais. O MN deve ser claramente separado dos núcleos principais.
- MN pode tocar, mas não sobrepõe os núcleos principais e a membrana do MN devem ser distinguíveis da membrana nuclear.
- MN usualmente tem a mesma intensidade de coloração que os núcleos principais, mas ocasionalmente a coloração do MN pode ser mais intensa.

3.2.6 Análise estatística

Na análise estatística dos dados do ensaio de MN foram utilizadas tabelas de contingência nas quais se compararam através do teste do Qui-Quadrado, dois grupos (cultura controle DMSO 5% e a cultura tratada com uma concentração de cada uma das substâncias nitroimidazólicas 1-8) ou a cultura controle e cultura tratada com o controle positivo quanto ao número de células com e sem micronúcleos no total de 2000 células analisadas por cultura (RICHARDSON et al, 1989).

Tabelas de contingência com 6 grupos (cultura controle-DMSO 5% e as 5 concentrações de cada sustância nitroimidazólica (1-8) ou a cultura controle e as 2 concentrações de COL foram analisadas pelo teste do Qui-Quadrado para análise de tendência linear (RICHARDSON et al, 1989).

O programa computacional GraphPad Prism® sexta versão (©1995-2015 GraphPad Software, Inc) foi empregado na análise estatística dos dados.

3.2.7 Avaliação e interpretação dos resultados

A substância é considerada positiva no ensaio de micronúcleo *in vitro* se em qualquer uma das condições experimentais examinadas:

- pelo menos uma das concentrações testadas haja um aumento estatisticamente significativo de indução de formação de micronúcleos quando comparado ao controle negativo concorrente;
- o aumento de indução de formação de micronúcleos for relacionado à concentração em pelo menos uma condição experimental quando avaliado com um teste apropriado para análise de tendência.

Quando estes dois critérios são cumpridos, a substância teste é então considerada ter a capacidade de induzir quebras cromossômicas e / ou ganho ou perda de cromossomos no sistema teste empregado (OECD, 2014).

A substância teste que induz a formação de MNs no ensaio de MN *in vitro* pode fazê-los porque induzem quebras cromossômicas, perdas cromossômicas, ou uma combinação dos dois eventos.

A substância é considerada negativa no ensaio de micronúcleo *in vitro* se em todas as condições experimentais examinadas:

- nenhuma das concentrações testadas exiba um aumento estatisticamente significativo de indução de formação de micronúcleos em comparação com o controle negativo concorrente;
- não haja um aumento de indução de formação de micronúcleos relacionado com a concentração quando avaliada com um teste de tendência apropriado.

A substância teste é então considerada não ter a capacidade de induzir quebras cromossômicas e / ou ganho ou perda de cromossomos no sistema teste empregado (OECD, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir apresentamos os resultados dos testes de citotoxicidade, do ensaio Cometa e do ensaio de micronúcleo em células sanguíneas humanas *in vitro* realizados com o MGZ (1) e com as sete substâncias análogas do MGZ sintetizadas por Farmanguinhos (2-8).

4.1 SUBSTÂNCIA 1 (MGZ)

4.1.1 Ensaio Cometa

A substância 1 (MGZ) de peso molecular (PM) 226 e fórmula química $C_6H_6N_6O_2S$ (Figura 1) foi testada em células sanguíneas humanas *in vitro*, no ensaio de citotoxicidade mediado pelo DAF e BrEt e em três ensaios Cometa (ensaio Cometa 1, ensaio Cometa 2 e ensaio Cometa 3) empregando-se dez concentrações de MGZ na faixa de 149 a 10.000 μM em DMSO 5%, que corresponde ao controle solvente.

No ensaio de citotoxicidade, o MGZ nas concentrações de 149 μM , 382 a 10.000 μM em DMSO 5% não induziu decréscimo de viabilidade celular quando comparado ao valor de 6% para o controle, DMSO 5% (Tabela 1). Apenas a concentração de 238 μM de MGZ apresentou valor de decréscimo de viabilidade celular de 10%, superior ao DMSO 5%, porém não houve um aumento de citotoxicidade nas concentrações subsequentes. As dez concentrações testadas apresentaram níveis aceitáveis de citotoxicidade, ou seja, não induziram valores superiores a 30% de decréscimo de viabilidade celular quando comparados ao DMSO 5% sendo, conseqüentemente empregadas no ensaio Cometa.

Tabela 1: Ensaio de citotoxicidade da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: 2 h a 37^o C

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controles:	
Controle celular	0,5%
Controle-solvente (DMSO 5%)	6,0%
Concentrações: megazol	
149 µM	4,5%
238 µM	10,0%
382 µM	1,5%
610 µM	5,5%
977 µM	3,5%
1.562 µM	3,0%
2.500 µM	4,5%
4.000 µM	6,0%
6.400 µM	3,5%
10.000 µM	2,5%

O Quadro 1 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o primeiro ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. A substância 1 (MGZ) foi genotóxica induzindo na concentração de 4000 µM, aumento na migração de DNA estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 µM, induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 1: Ensaio Cometa 1 da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	96,5	3,5	0	0	7
Controle solvente (DMSO 5%)	95,0	4,5	0,0	0,5	12
Concentrações megazol					
149 µM	91,5	7,0	0,0	1,5	23
238 µM	93,5	4,5	0,0	2,0	21
382 µM	93,5	5,0	0,0	1,5	19
610 µM	95,5	3,0	0,5	1,0	14
977 µM	89,5	10,5	0,0	0,0	21
1.562 µM	80,5	19,0	0,0	0,5	41
2.500 µM	88,0	11,5	0,5	0,0	25
4.000 µM	61,0	37,5	1,0	0,5	82 *
6.400 µM	66,0	31,0	1,0	2,0	78
10.000 µM	61,5	34,0	2,5	2,0	90
Controle positivo					
MMS 160 µM ¹	0,0	0,0	6,5	93,5	587 ***

¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

O Quadro 2 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o segundo ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. O MGZ foi genotóxico induzindo na concentração de 6400 μM e 10000 μM , aumento na migração de DNA estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparadas ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle.

Quadro 2: Ensaio Cometa 2 da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	99,0	1,0	0	0	2
Controle solvente (DMSO 5%)	97,0	2,0	0,0	1,0	10
Concentrações megazol					
149 μM	97,5	1,5	0,0	1,0	9
238 μM	97,5	2,0	0,0	0,5	7
382 μM	98,5	1,0	0,0	0,5	5
610 μM	98,5	0,5	0,0	1,0	7
977 μM	92,5	7,0	0,5	0,0	16
1.562 μM	89,0	11,0	0,0	0,0	22
2.500 μM	95,0	5,0	0,0	0,0	10
4.000 μM	83,5	15,5	1,0	0,0	35
6.400 μM	86,5	11,5	0,5	1,5	34 *
10.000 μM	83,5	15,5	0,5	0,5	36 *
Controle positivo					
MMS 160 μM ¹	0,0	1,5	20,0	78,5	554 ***

¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

O Quadro 3 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o terceiro ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. O MGZ foi genotóxico induzindo nas concentrações de 238 μM , 610 μM , 6400 μM e 10000 μM , aumento na migração de DNA estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 3: Ensaio Cometa 3 da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	95,5	4,5	0,0	0,0	9
Controle solvente (DMSO 5%)	91,5	6,5	0,0	2,0	25
Concentrações megazol					
149 µM	91,5	7,0	0,0	1,5	23
238 µM	87,5	10,0	0,0	2,5	35 *
382 µM	92,0	5,0	1,0	2,0	26
610 µM	90,0	5,5	0,0	4,5	38 *
977 µM	86,5	11,5	1,0	1,0	33
1.562 µM	87,0	11,5	0,0	1,5	32
2.500 µM	89,5	9,5	0,0	1,0	25
4.000 µM	91,5	7,5	0,0	1,0	21
6.400 µM	71,5	25,0	0,5	3,0	70 *
10.000 µM	65,5	33,0	0,0	1,5	75 *
Controle positivo					
MMS 160 µM ¹	0,0	0,0	9,0	91,0	582 ***

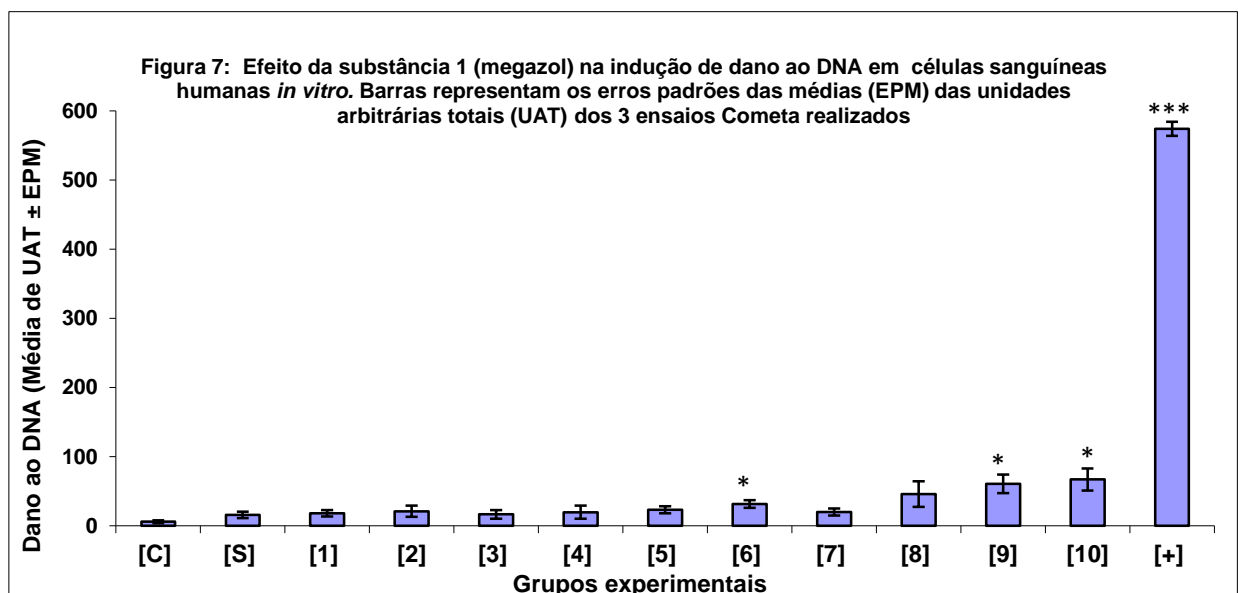
¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Ao se combinar os resultados de dano ao DNA em UAT nos 3 ensaios Cometa independentemente realizados com a substância 1 (MGZ: 149 a 10.000 µM) verificou-se que o tratamento das células sanguíneas humanas com o MGZ, induziu dano significativo ao DNA ($p < 0,05$) em três concentrações (1.562, 6.400 e 10.000 µM) quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo (MMS 160 µM) induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular. O quadro 4 e a figura 7 mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média para os três ensaios realizados com as dez concentrações do MGZ, para os controles negativos (DMSO 5% e controle) e controle positivo (MMS 160 µM).

Quadro 4: Ensaio Cometa da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas *in vitro*. Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades arbitrárias totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 3 ensaios realizados

Grupos	Média (UAT)	Erro padrão da média (UAT)	Teste t (p) ¹
Controles:			
Controle celular	6,00	2,08	-
Controle-solvente (DMSO 5%)	15,67	4,70	-
Concentrações: megazol			
149 μ M	18,33	4,67	0,354
238 μ M	21,00	8,08	0,300
382 μ M	16,67	6,17	0,452
610 μ M	19,67	9,39	0,361
977 μ M	23,33	5,04	0,164
1.562 μ M	31,67	5,49	0,046 *
2.500 μ M	20,00	5,00	0,281
4.000 μ M	46,00	18,45	0,093
6.400 μ M	60,67	13,53	0,017 *
10.000 μ M	67,00	16,09	0,019 *
Controle positivo:			
MMS 160 μ M ²	574,33	10,27	0,000 ***

¹Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. ²Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.



[C] Controle [S]. Controle-solvente DMSO 5%. Concentrações da substância 1 (megazol): [1] 149 μ M, [2] 238 μ M, [3] 382 μ M, [4] 610 μ M, [5] 977 μ M, [6] 1.562 μ M, [7] 2.500 μ M, [8] 4.000 μ M, [9] 6.400 μ M, [10] 10.000 μ M. [+] Metanosulfonato de metila 160 μ M. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular

4.1.2 Ensaio de Micronúcleo

A substância 1 em DMSO 5% não foi citotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* (tratamento: 4h) nas concentrações de 150 μM e 640 μM e citotóxica nas concentrações 1.600, 4.000 e 10.000 μM evidenciada pela diminuição dos respectivos IPBC e IR quando comparados ao controle-solvente. A diminuição dos dois índices foi concentração-dependente induzindo uma inibição do crescimento celular (% de atividade citostática) de 31% na concentração de 1600 μM , 50% em 4.000 μM e de 63% em 10.000 μM relacionado ao IPBC e de 31%, 51%, 62% de atividade citostática, respectivamente em relação às concentrações, 1600 μM , 4000 μM e 10.000 μM relacionados ao IR (Quadro 5).

A partir dos resultados de citotoxicidade definiu-se 4.000 μM como a concentração máxima da substância 1 (megazol) a ser analisada quanto ao número de células micronucleadas por 2000 células binucleadas, pois nesta concentração houve uma redução de 50% de crescimento celular em relação ao controle DMSO 5% (OECD, 2014).

O MGZ induziu aumento altamente significativo ($p < 0,01$) de formação de micronúcleos em células sanguíneas humanas *in vitro* nas concentrações de 1.600 e 4000 μM quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. Adicionalmente, o aumento de indução de formação de micronúcleos foi concentração-dependente ($p < 0,001$) quando avaliado pelo teste Qui-quadrado para análise de tendência linear ($p < 0,0001$). O controle positivo COL 0,02 $\mu\text{g/mL}$ induziu aumento significativo ($p < 0,05$) de células micronucleadas em células binucleadas em relação ao controle celular (Quadro 5). Conclui-se que o MGZ induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro*.

Quadro 5: Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese da substância 1 (megazol) em células sanguíneas humanas

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS/500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		ENSAIO DE MICRONÚCLEO		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC ¹	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR ²	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)	TESTE QUI-QUADRADO (p) ³	
Controles										
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
Controle Celular	357	125	18	1,322	-	-	-	20	13	-
								NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
Controle Solvente (DMSO 5%)	368	117	15	1,294	-	-	-	24		-
Concentrações Substância 1										
150 µM	345	139	16	1,342	-16%	119%	-19%	24		p= 0,884
640 µM	363	123	14	1,302	-3%	105%	-5%	20		p= 0,649
1.600 µM	409	81	10	1,202	31%	69%	31%	47		p= 0,008 **
4.000 µM	435	57	8	1,146	50%	49%	51%	50		p= 0,003 **
10.000 µM ⁴	451	44	5	1,108	63%	38%	62%	-		-
Controle positivo										
MMC ⁵ 0,5 µg/mL	334	154	12	1,356	-10%	123%	-23%	20		p=0,294
MMC ⁵ 1,0 µg/mL	390	107	3	1,226	30%	85%	15%	22		p=0,174
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL ⁶ 0,02 µg/mL	371	112	17	1,292	9%	90%	10%	28	30	p= 0,309 (MONONUCLEADA) p= 0,014 * (BINUCLEADA)

¹Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese (indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B). ²Índice de replicação, indica a proporção de ciclos de divisão celular completos. ³Valores de p no teste do Qui-Quadrado. ⁴Análise de micronúcleos não considerada em 10.000 µM devido á indução de inibição de crescimento celular superior a 50%. ⁵Mitomomicina C. ⁶Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina). Pelo teste de Qui-Quadrado, *significa aumento de células micronucleadas em células binucleadas estatisticamente significativo (p<0,05) em relação ao controle celular, ** aumento de células micronucleadas altamente significativo (p<0,01) em relação ao controle-solvente.

4.1.3 Importância do estudo da genotoxicidade de análogos ao MGZ

A substância 2-nitroimidazólica, benznidazol (BZN) e a 5-nitrofurânica, nifurtimox (NFX) são as únicas drogas disponíveis para o tratamento da doença de Chagas. Entretanto, estes nitroderivados mostram pouca atividade na fase crônica tardia da doença, causando efeitos colaterais severos e limitada eficácia contra diferentes isolados do parasito, justificando-se, desta forma, a necessidade urgente de se identificar alternativas para o tratamento de pacientes chagásicos (SOEIRO; DE CASTRO, 2011; URBINA 2014). Esta doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que afeta aproximadamente 8 milhões de indivíduos na América Latina. Além disso, é uma doença emergente em áreas não endêmicas que está associada à imigração de pessoas infectadas (GASCON et al., 2010; SCHMUNIS; YADON 2010; FRANÇA et al., 2014). O MGZ, 2-amino-5-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)-1,3,4,tiadiazol, substância nitroimidazólica com um anel tiadiazólico, mostra alta atividade *in vitro* e *in vivo* contra o *Trypanosoma cruzi*, incluindo as cepas resistentes ao BZN (FILARDI; BRENER 1982, DE CASTRO; DE MEIRELLES 1986; LAGES-SILVA et al., 1990; BUSCHINI et al., 2007; SALOMÃO et al. 2010) e ao *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da tripanosomíase africana humana ou doença do Sono (BOUTEILLE et al., 1995; ENANGA et al., 1998, 2000; BODA et al., 2004). Vários estudos indicam claramente que o MGZ penetra no parasito por difusão passiva (BARRETT et al., 2003) e uma vez no interior da célula sofre ativação por enzimas nitroredutases. Estas enzimas catalisam a redução do grupo nitro do anel imidazólico (VIODÉ et al., 1999; WILKINSON; KELLY, 2009). Os mecanismos subsequentes responsáveis pelo modo de ação do MGZ ainda não são claros. A partir de estudos com *T.cruzi* postulou-se a interferência do MGZ com o metabolismo de oxigênio do parasito (VIODÉ et al., 1999), possivelmente por afetar os níveis intracelulares de tiol, especialmente de tripanotiona, cofator para tripanotiona redutase, enzima essencial no processo de desintoxicação (MAYA et al., 2003) e/ou via inibição da atividade NADH fumarato redutase (TURRENS et al., 1996). Alternativamente, o MGZ mediou dano ao DNA em mutantes de *T.cruzei* deficientes em RAD51, fundamental na via de reparo do DNA homólogo do parasito (ENANGA et al., 2003). Apesar de sua potente atividade tripanomicida, o MGZ não foi aprovado para uso clínico devido aos relatos de efeitos mutagênicos e genotóxicos *in vitro* associados com a redução do grupo nitro (FERREIRA;

FERREIRA 1986a, 1986b; POLI et al., 2002; NESSLANY et al., 2004), porém a natureza do metabolito mutagênico ainda não foi caracterizado. A mutagenicidade do MGZ foi evidenciada no ensaio bacteriano de Ames empregando as cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA102 que detectam mutágenos indutores de mutações por deslocamento de quadro de leitura em concentrações bem baixas, como 0,1 µg/mL. Nenhuma atividade mutagênica foi observada com a cepa TA100 que detecta substituições por pares de base em *spot* testes. Não ocorreu aumento no número de mutantes induzidos na presença de fração microsomal de fígado de rato (FERREIRA; FERREIRA, 1986a). A cepa TA98 deficiente em sistema de reparo por excisão foi muito mais sensível à ação letal de MGZ do que a cepa TA102, uma cepa proficiente de reparo (FERREIRA; FERREIRA, 1986b).

O tratamento de linfócitos humanos *in vitro* durante 4h pelo MGZ, na presença de ativação metabólica exógena induziu na concentração de 1,25 mM aumento da formação de MNs e de aberrações cromossômicas estruturais na faixa de 0,156 a 0,625 mM (NESSLANY et al., 2004). Devido aos relatos de mutagenicidade do MGZ, investigações adicionais empregando-o como agente tripanomicida foram descontinuadas. Conseqüentemente, o MGZ tornou-se uma substância-alvo promissora para a pesquisa de análogos com atividade tripanomicida, porém, sem os efeitos mutagênicos.

Desde que a mutagenicidade é uma propriedade indesejável para drogas empregadas clinicamente que pode estar relacionada ao seu potencial carcinogênico, estudos são necessários para se avaliar o efeito dos compostos nitroimidazólicos, em especial o MGZ, sobre o DNA contribuindo-se desta forma para a elucidação de mecanismos envolvidos nesses processos. Um composto nitroimidazólico apresentando atividade farmacológica sem mutagenicidade deveria ser de grande interesse não somente do ponto de vista de segurança, mas também por fornecer os subsídios para investigações futuras sobre o modo de ação e o mecanismo de expressão da mutagenicidade (MITAL, 2009).

4.1.4 Ensaio Cometa e micronúcleo *in vitro* do MGZ (substância 1) – contextualização com os dados da literatura.

O MGZ, sintetizado por Carvalho e colaboradores (2007), após 2h de tratamento *in vitro*, nas concentrações de 1562 μM , 6400 μM e 10.000 μM causou significativa ($p < 0,05$) quebra de fita de DNA em células sanguíneas humanas (linfócitos) sendo que, 10.000 μM , foi a concentração máxima testada *in vitro* para substâncias relativamente não citotóxicas (TICE et al., 2000). O dano ao DNA não foi associado à citotoxicidade, pois nestas concentrações não ocorreu letalidade celular quando comparado ao controle-solvente. O MGZ (149 μM a 10.000 μM) não foi citotóxico em células sanguíneas humanas (linfócitos), com exceção da concentração de 238 μM com leve decréscimo de viabilidade celular de 4 %. Resultados semelhantes foram obtidos por Carvalho e colaboradores (2014) e Boechat e colaboradores (2015) que relataram efeito genotóxico altamente significativo do MGZ ($p < 0,01$) no mesmo sistema-teste e condições experimentais para as concentrações de 1562 μM , 2500 μM e 4000 μM sem redução da viabilidade celular na faixa testada (380-4,000 μM). O ensaio Cometa realizado em células Vero, linfócitos e sangue total (POLI et al., 2002) foi altamente sensível na detecção da genotoxicidade do MGZ em concentrações na faixa de 8,8 a 35 μM , bem inferiores às empregadas por Nesslany e colaboradores (2004) com o mesmo período de tratamento de 4h. Poli e colaboradores (2002) mostraram em leucócitos frescos provenientes de rato e camundongo uma relação dose-resposta de dano ao DNA induzido pelo MGZ. As evidências em células Vero sugeriram uma complexa relação entre o dano ao DNA e o tempo de tratamento e a possível indução de mecanismos de reparo. MGZ mostrou diferentes atividades biológicas em relação aos tipos celulares e às condições experimentais (na ausência ou na presença de curto ou longo tempo de exposição ao citocromo P-450, com ou sem outras genotoxinas), consequentemente sugerindo uma modulação de eficácia por diferentes condições fisiológicas/biológicas das células.

Nossos resultados mostraram que o MGZ foi mutagênico em linfócitos humanos aumentando significativamente ($p < 0,01$) a formação de micronúcleos nas concentrações de 1.600 e 4.000 μM de forma concentração dependente após período de tratamento de 4h. O MGZ não inibiu o crescimento celular nas menores concentrações (150 μM e 640 μM), As concentrações de 1.600 e 4.000 μM foram

citotóxicas induzindo 31% e 50% de redução do índice de proliferação quando comparados ao controle-solvente. A mais alta concentração de MGZ (10.000 μM), não foi avaliada quanto à indução de MNs, por ter causado 62% de redução do IPBC, superior ao limite máximo de 50% de citotoxicidade recomendado pela OECD (2014) para análise. Nessler e colaboradores (2004) também relataram para o MGZ fornecido por Far-Manguinhos da Fiocruz uma alta atividade genotóxica no ensaio de micronúcleo *in vitro* em células de linfoma de camundongo L5178Y sem ativação metabólica e tratamento por 24h, nas concentrações 625 μM e 1250 μM sendo estas concentrações genotóxicas desprovidas de citotoxicidade. Na presença de ativação metabólica, a genotoxicidade do MGZ após 4h de tratamento foi somente observada na mais alta concentração testada (1,25 mM) sem ocorrência de citotoxicidade. Nessler e colaboradores (2004) ao empregar linfócitos humanos *in vitro* tratados durante 4h pelo MGZ, na presença de ativação metabólica exógena observaram na concentração de 1,25 mM aumento da formação de MNs e de aberrações cromossômicas estruturais nas concentrações 156 μM . e 625 μM .

Adicionalmente, O MGZ teve a sua mutagenicidade confirmada em outros ensaios em células de mamífero *in vitro* e em *in vivo*. O MGZ proveniente de Far-Manguinhos foi um potente indutor de aberrações cromossômicas estruturais *in vitro* em linfócitos humanos após 4h de tratamento na mais alta concentração possível de ser analisada devido à citotoxicidade (0,625 mM); aumento significativo nas 3 concentrações (0,156 mM, 0,312 mM e 0,625 mM) para o tratamento de 20h e em 0,357 mM e 0,625 mM para o tratamento de 44h. Na presença de ativação metabólica exógena, houve aumento significativo de células com aberrações cromossômicas estruturais, nas concentrações de 0,156 mM e 0,625 mM de MGZ, para o tratamento de 4h. No ensaio de micronúcleo *in vivo* em células de medula óssea de ratos, as duas doses diárias (2 dias) administradas sucessivamente por via oral (500 mg/kg e 1000 mg/kg), com amostragem 24h após a segunda dose induziram aumento significativo na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em ratos Sprague-Dawley de ambos os sexos. Embora o MGZ seja um potente agente tripanomicida e biodisponível quando administrado por via oral, sua toxicidade impôs a descontinuação do processo de seu desenvolvimento para o tratamento da doença de Chagas e da doença do Sono (NESSLANY et al., 2004).

Em sistema-teste bacteriano, evidenciou-se a mutagenicidade do MGZ no teste de Ames nas cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA102 que detectam mutágenos indutores de mutações por deslocamento de quadro de leitura em concentrações bem baixas, como 0,1 µg/mL. Nenhuma atividade mutagênica foi observada com a cepa TA100 que detecta substituições por pares de base em *spot* testes. Não ocorreu aumento no número de mutantes induzidos na presença de fração microsomal de fígado de rato (FERREIRA; FERREIRA, 1986a). A cepa TA98 deficiente em sistema de reparo por excisão foi muito mais sensível à ação letal de MGZ do que a cepa TA102, uma cepa proficiente de reparo (FERREIRA; FERREIRA, 1986b). O MGZ induziu mutagenicidade em cepas TA98 e TA98dnp₆ de *Salmonella typhimurium*, mas não em cepa deficiente em redutase TA98nr. A presença de mistura S9 não restaurou a atividade mutagênica do MGZ na cepa TA98nr. Atividade mutagênica foi detectada em amostras séricas de cobaias tratadas pelas cepas TA98 e TA98dnp₆ proficientes em nitroredutase, mas não pela cepa deficiente em nitroredutase TA98nr. Na urina, a atividade mutagênica foi observada com todas as 3 cepas sugerindo uma ativação metabólica *in vivo* por uma via metabólica distinta (DE MORAIS et al., 1998). O MGZ quando testado na faixa de 0,05 a 1,0 µg/mL mostrou atividade mutagênica altamente significativa no teste de Ames em concentrações bem baixas na presença e ausência de mistura S9, respectivamente em 4 cepas de *Salmonella typhimurium*: cepa TA97 (-S9: 0,1-1,0 µg/mL; +S9: 0,2-1,0 µg/mL), TA98 (-S9: 0,2-1,0 µg/mL; +S9: 0,5-1,0 µg/mL); TA100 (-S9: 0,1-1,0 µg/mL; +S9: 0,1-1,0 µg/mL) e TA102 (-S9: efeito negativo; +S9: 0,05-1,0 µg/mL). (MELLO et al, 2013).

4.1.4.1 Atividade tripanomicida do MGZ

O MGZ mostrou um marcante efeito curativo em camundongos experimentalmente infectados com *T.cruzi*. Quando doses de 50 ou 100 mg/kg foram usadas por 20 dias consecutivos, curas parasitológicas foram obtidas em 100% dos animais. Altos níveis de cura foram também observados com uma única dose de 500 mg/kg de MGZ (FILARDI; BRENER, 1982).

Bouteille e colaboradores (1995), observaram para o MGZ, atividade *in vitro* contra o *T.brucei brucei* uma concentração efetiva média (CE₅₀=0,01µg/mL). Quando esta substância foi testada *in vivo* quanto à sua atividade em camundongos Suíço

infectados, observou-se cura da doença aguda. Entretanto MGZ não causou a cura de camundongos com uma infecção subaguda com envolvimento do sistema nervoso central (BOUTEILLE et al., 1995).

O MGZ fornecido por Far-Manguinhos apresentou alta atividade tripanomicida *in vitro*, ou seja, uma dose letal média ($DL_{50} = 9,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$) para o *T. cruzi* e uma concentração inibitória média ($CI_{50} = 0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$) para o *T. brucei* (CARVALHO et al., 2007; CARVALHO et al., 2014; BOECHAT et al., 2015).

4.2 SUBSTÂNCIA 2

4.2.1 Ensaio Cometa

A substância 2 de PM 209 e fórmula química $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_7\text{O}_2$ (Figura 1) foi testada em células sanguíneas humanas *in vitro* em dois ensaios Cometa empregando-se nove concentrações da substância na faixa de 149 μM a 6.400 μM em DMSO 5%, que corresponde ao controle solvente.

No ensaio de citotoxicidade, a substância 2 na faixa de concentrações testada de 149 μM a 6400 μM em DMSO 5% não foi citotóxica, não induzindo decréscimo de viabilidade celular nas concentrações 610 μM , 977 μM , 4000 μM e 6400 μM e causando somente 1% de letalidade nas demais concentrações quando comparada ao controle-solvente (Tabela 2). As nove concentrações testadas apresentaram níveis aceitáveis de citotoxicidade, ou seja, não induziram valores superiores a 30% de decréscimo de viabilidade celular quando comparados ao DMSO 5% sendo, conseqüentemente empregadas no ensaio Cometa.

Tabela 2: Ensaio de citotoxicidade da substância 2 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: 2 h a 37^o C

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controles:	
Controle celular	0%
Controle-solvente (DMSO 5%)	0%
Concentrações: substância 2	
149 µM	1%
238 µM	1%
382 µM	1%
610 µM	0%
977 µM	0%
1.562 µM	1%
2.500 µM	1%
4.000 µM	0%
6.400 µM	0%

O quadro 6 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o primeiro ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. A substância 2 não foi genotóxica, não induzindo na faixa de concentrações testada (149 a 6.400 µM) aumento na migração de DNA estatisticamente significativo ($p > 0,05$), quando comparada ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 µM, induziu efeito genotóxico bem evidente e altamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle celular.

Quadro 6: Ensaio Cometa 1 da substância 2 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (UAT)

Grupos	Classes de dano ao DNA				UAT
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	93,0	7,0	0,0	0,0	14
Controle solvente (DMSO 5%)	87,0	8,0	4,0	1,0	38
Concentrações Substância 2					
149 µM	92,5	6,0	0,5	1,0	20
238 µM	88,0	11,5	0,0	0,5	26
382 µM	86,0	12,5	1,5	0,0	31
610 µM	85,5	9,5	3,5	1,5	42
977 µM	79,0	16,5	4,0	0,5	52
1.562 µM	91,5	6,5	2,0	0,0	21
2.500 µM	79,5	17,5	2,0	1,0	49
4.000 µM	75,0	21,0	3,5	0,5	59
6.400 µM	69,0	22,5	5,0	3,5	86
Controle positivo					
MMS 160 µM ¹	0,0	12,5	11,0	76,5	528 **

¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, o asterisco ** indica, aumento de migração de DNA altamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle-solvente.

O quadro 7 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o segundo ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. A substância 2 não foi genotóxica, não induzindo na faixa de concentrações testadas (149 a 6.400 μM) aumento na migração de DNA estatisticamente significativo ($p > 0,1$), quando comparada ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 7: Ensaio Cometa 2 da substância 2 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (UAT)

Grupos	Classes de dano ao DNA				UAT
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	97,5	2,0	0,0	0,5	7
Controle solvente (DMSO 5%)	95,0	2,0	2,0	1,0	18
Concentrações Substância 2					
149 μM	96,0	2,5	0,0	1,5	14
238 μM	99,0	0,5	0,0	0,5	4
382 μM	96,5	1,5	1,0	1,0	13
610 μM	98,5	0,5	0,5	0,5	6
977 μM	95,0	3,5	0,0	1,5	16
1.562 μM	95,5	2,0	0,5	2,0	18
2.500 μM	96,0	1,5	0,5	2,0	17
4.000 μM	91,0	6,5	1,5	1,0	25
6.400 μM	88,5	8,0	2,0	1,5	33
Controle positivo					
MMS 160 μM [†]	1,5	12,5	16,5	69,5	508 ***

[†]Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos*** indica aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

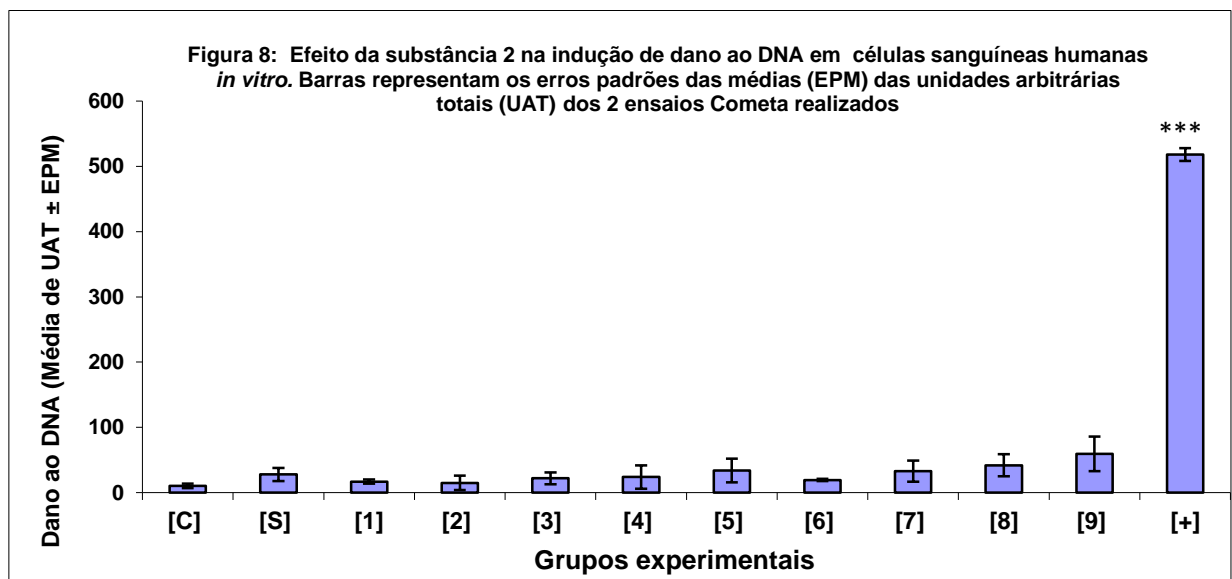
Ao se combinar os resultados do dano ao DNA em UAT nos dois ensaios Cometa independentes realizados, verificou-se que o tratamento das células sanguíneas humanas com a substância 2 na faixa de concentrações de 149 μM a 6.400 μM não induziu aumento na migração de DNA estatisticamente significativo ($p > 0,1$), quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular. O Quadro 8 e a figura 8 mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média para os dois

ensaios realizados com as nove concentrações da substância 2, para os controles negativos (DMSO 5% e controle celular) e controle positivo (MMS 160 μM).

Quadro 8: Ensaio Cometa da substância 2 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados

Grupos	Média (U.A.T.)	Erro padrão da média (U.A.T.)	Teste t (p) ¹
Controles:			
Controle celular	10,50	3,50	-
Controle Solvente (DMSO 5%)	28,00	10,00	-
Concentrações Substância 2			
149 μM	17,00	3,00	0,201
238 μM	15,00	11,00	0,237
382 μM	22,00	9,00	0,350
610 μM	24,00	18,00	0,432
977 μM	34,00	18,00	0,399
1.562 μM	19,50	1,50	0,244
2.500 μM	33,00	16,00	0,408
4.000 μM	42,00	17,00	0,276
6.400 μM	59,50	26,50	0,191
Controle Positivo:			
MMS 160 μM ²	518,00	10,00	0,0002 ***

¹Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. ²Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos *** indicam, aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.



[C] Controle [S]. Controle-solvente DMSO 5%. Concentrações da substância 2: [1] 149 μM , [2] 238 μM , [3] 382 μM , [4] 610 μM , [5] 977 μM , [6] 1.562 μM , [7] 2.500 μM , [8] 4.000 μM , [9] 6.400 μM , [10] 10.000 μM . [+] Metanosulfonato de metila 160 μM . Pelo teste t de *Student*, os asteriscos *** indicam, aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular

4.2.2 Ensaio de Micronúcleo

A substância 2 em DMSO 5% não foi citotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* (tratamento: 4h) nas concentrações de 150 µM, 640 µM e 1600 µM quando medida pelo IPBC e nas concentrações de 150 µM e 640 µM quando medida pelo IR. A citotoxicidade da substância 2 foi evidenciada nas duas maiores concentrações (4.000 µM e 10.000 µM) através da diminuição do IPBC e em três concentrações (1.600 µM, 4.000 µM e 10.000µM) pela diminuição do IR quando comparados ao controle-solvente. A diminuição dos dois índices foi concentração-dependente induzindo uma inibição do crescimento celular (% de atividade citostática) de 73% na concentração de 4000 µM e de 74% em 10.000 µM referente ao IPBC e de 24%, 78% e 77% de atividade citostática quando medida pelo IR, respectivamente em relação às concentrações de 1.600 µM, 4.000 µM e 10.000 µM da substância 2 (Quadro 9).

A partir dos resultados de citotoxicidade definiu-se 1600 µM como a concentração máxima da substância 2 a ser analisada quanto ao número de células micronucleadas por 2000 células binucleadas, pois nesta concentração houve uma redução de 24% de crescimento celular em relação ao controle DMSO 5%, abaixo do valor limite de 50% (OECD, 2014).

A substância 2 induziu aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de formação de micronúcleos em células sanguíneas humanas *in vitro* na concentração de 1.600 µM quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. Adicionalmente, o aumento de indução de formação de micronúcleos foi concentração-dependente ($p < 0,05$) quando avaliado pelo teste Qui-Quadrado para análise de tendência linear ($p = 0,0110$). O controle positivo MMC 1,0 µg/ml, induziu aumento extremamente significativo ($p < 0,0010$) de células micronucleadas em relação ao controle celular sendo este aumento concentração-dependente ($p < 0,001$) com valor de $p = 0,0004$. O controle positivo COL 0,02 µg/mL induziu aumento altamente significativo ($p < 0,01$) de células micronucleadas em células mononucleadas e binucleadas em relação ao controle celular (Quadro 9). Conclui-se que a substância 2 induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro*.

Quadro 9: Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese da substância 2 em células sanguíneas humanas.

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS/500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		ENSAIO DE MICRONÚCLEO		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC ¹	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR ²	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)	TESTE QUI-QUADRADO (p) ³	
Controles										
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
Controle Celular	390	102	8	1,236	-	-	-	20	13	-
								NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
Controle Solvente (DMSO 5%)	403	94	3	1,200	-	-	-	25		-
Concentrações Substância 2										
150 µM	395	100	5	1,220	-10%	106%	-6%	28		p= 0,782
640 µM	392	101	7	1,230	-15%	107%	-7%	36		p= 0,197
1.600 µM	410	71	19	1,218	-9%	76%	24%	44		p= 0,029 *
4.000 µM ⁴	476	21	3	1,054	73%	22%	78%	-		-
10.000 µM ⁴	476	22	2	1,052	74%	23%	77%	-		-
Controle positivo										
MMC ⁵ 0,5 µg/mL	434	62	4	1,140	41%	61%	-39%	24		p=0,099
MMC ⁵ 1,0 µg/mL	427	70	3	1,152	36%	69%	31%	38		p=0,0007 ***
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL ⁶ 0,02 µg/mL	387	91	22	1,270	-14%	89%	11%	42	37	p= 0,007 ** (MONONUCLEADA) p= 0,001 ** (BINUCLEADA)

¹Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese (indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B). ²Índice de replicação, indica a proporção de ciclos de divisão celular completos. ³Valores de p no teste do Qui-Quadrado. ⁴Análise de micronúcleos não considerada em 4.000 µM e 10.000 µM devido á indução de inibição de crescimento celular superior a 50%. ⁵Mitomomicina C. ⁶Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina). Pelo teste de Qui-Quadrado, *significa aumento de células micronucleadas estatisticamente significativo (p<0,05) em relação ao controle solvente, ** aumento de células micronucleadas altamente significativo (p<0,01) em relação ao controle celular, *** aumento de células micronucleadas extremamente significativo (p<0,001) em relação ao controle celular.

4.2.3 Ensaios Cometa e micronúcleo *in vitro* da substância 2 – contextualização com os dados da literatura.

A substância 2, sintetizada por Carvalho e colaboradores (2007), após 2h de tratamento na faixa de concentrações de 149 μM a 6.400 μM não causou ($p > 0,1$) quebra de fita de DNA em células sanguíneas humanas (linfócitos) *in vitro* quando comparado ao controle solvente.

A substituição do átomo de enxofre no anel tiodiazólico do MGZ pelo nitrogênio no núcleo triazólico presente na substância 2 aboliu o efeito de quebra de fita de DNA e reduziu acentuadamente a atividade tripanomicida contra o *T.cruzi* e *T.brucei*. A DL_{50} do MGZ em relação ao *T.cruzi* e *T.brucei* foram respectivamente, $9,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ e $0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$, enquanto para a substância 2, os valores de DL_{50} para *T.cruzi* e *T.brucei* foram respectivamente, $256,8 \pm 53,0 \mu\text{M}$ e $> 40 \mu\text{M}$ (CARVALHO et al., 2014).

No ensaio de micronúcleo, a substância 2 induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos ($p < 0,05$) em células sanguíneas humanas (linfócitos) após 4h de tratamento *in vitro* somente na concentração de 1.600 μM quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. O dano ao DNA não foi associado à citotoxicidade, pois nesta concentração a substância 2 não reduziu o IPBC e causou uma redução de 24% do IR quando comparado ao controle-solvente e portanto abaixo do valor limite de 50% recomendado pela OECD para análise de micronúcleos (OECD, 2014). A substituição do enxofre no anel tiodiazólico do MGZ pelo nitrogênio gerando o anel triazólico na substância 2 não foi capaz de abolir o efeito clastogênico (quebras cromossômicas) e/ou aneugênico (perda ou ganho de cromossomos) do MGZ. No MGZ, além da concentração de 1600 μM , 4000 μM também induziu quebra de fita de DNA. Quanto à citotoxicidade quando comparada ao MGZ, tal alteração causou somente uma leve queda de citotoxicidade na dose de 1600 μM quando medida pelo IR, enquanto nas concentrações seguintes de 4.000 μM e 10.000 μM , houve reduções de IR das células sanguíneas cerca de 27% e 15% superiores aos valores obtidos para o MGZ.

4.3 SUBSTÂNCIA 3

4.3.1 Ensaio Cometa

A substância 3 (Figura 1) de PM 277 e fórmula química $C_7H_6F_3N_7O_2$ foi testada em células sanguíneas humanas *in vitro*, no ensaio de citotoxicidade mediado pelo DAF e BrEt e em dois ensaios Cometa (ensaio Cometa 1, ensaio Cometa 2) empregando-se dez concentrações da substância na faixa de 149 μM a 10.000 μM em DMSO 5%, que corresponde ao controle solvente.

No ensaio de citotoxicidade, a substância 3 nas concentrações de 149 a 2500 μM em DMSO 5% não induziu decréscimo de viabilidade celular quando comparado ao valor de 0% para o controle DMSO 5% (Tabela 3). Apenas as 3 maiores concentrações (4.000, 6.400 e 10.000 μM) causaram níveis reduzidos e aceitáveis de citotoxicidade inferiores a 30% (2%, 1% e 2% respectivamente) e desta forma, todas as concentrações foram empregadas nos dois ensaios Cometa realizados.

Tabela 3: Ensaio de citotoxicidade da substância 3 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: 2 h a 37^o C

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
<u>Controles:</u>	
Controle	0%
Controle-solvente (DMSO 5%)	0%
<u>Concentrações: substância 3</u>	
149 μM	0%
238 μM	0%
382 μM	0%
610 μM	0 %
977 μM	0%
1.562 μM	0%
2.501 μM	0%
4.000 μM	2%
6.400 μM	1%
10.000 μM	2%

O Quadro 10 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o primeiro ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. A substância 3 foi genotóxica induzindo nas concentrações de 2.500 μM e 10.000 μM , aumentos na migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparados ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 10: Ensaio Cometa 1 da substância 3 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	96,0	3,5	0,0	0,5	10
Controle solvente (DMSO 5%)	93,0	4,0	1,0	2,0	24
Concentrações Substância 3					
149 μM	91,5	6,0	0,0	2,5	27
238 μM	93,5	6,5	0,0	0,0	13
382 μM	91,0	8,5	0,0	0,5	20
610 μM	95,5	2,5	1,0	1,0	15
977 μM	87,5	6,0	0,5	6,0	50
1.562 μM	87,5	12,0	0,0	0,5	27
2.500 μM	78,0	19,0	1,0	2,0	54 *
4.000 μM	86,0	12,0	1,0	1,0	34
6.400 μM	73,0	23,5	2,0	1,5	64
10.000 μM	72,5	23,0	2,5	2,0	68 *
Controle Positivo					
MMS 160 μM ¹	0,0	8,5	16,0	75,5	534 ***

¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

O Quadro 11 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o segundo ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. A substância 3 foi genotóxica induzindo nas duas maiores concentrações (6.400 μM e 10.000 μM) aumentos na migração de DNA estatisticamente significativos ($p < 0,05$), quando comparados ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 11: Ensaio Cometa 2 da substância 3 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	95,5	4,5	0,0	0,0	9
Controle solvente (DMSO 5%)	94,5	3,0	0,0	2,5	21
Concentrações Substância 3					
149 μM	96,5	3,0	0,0	0,5	9
238 μM	97,0	3,0	0,0	0,0	6
382 μM	96,0	3,5	0,0	0,5	10
610 μM	95,0	4,5	0,0	0,5	12
977 μM	86,0	6,0	0,0	8,0	60
1.562 μM	89,5	5,5	0,0	5,0	41
2.500 μM	92,5	4,0	0,0	3,5	29
4.000 μM	88,5	7,0	1,0	3,5	39
6.400 μM	85,5	8,5	1,0	5,0	51 *
10.000 μM	82,0	13,5	0,5	4,0	53 *
Controle Positivo					
MMS 160 μM ¹	0,0	9,0	6,0	85,0	552 ***

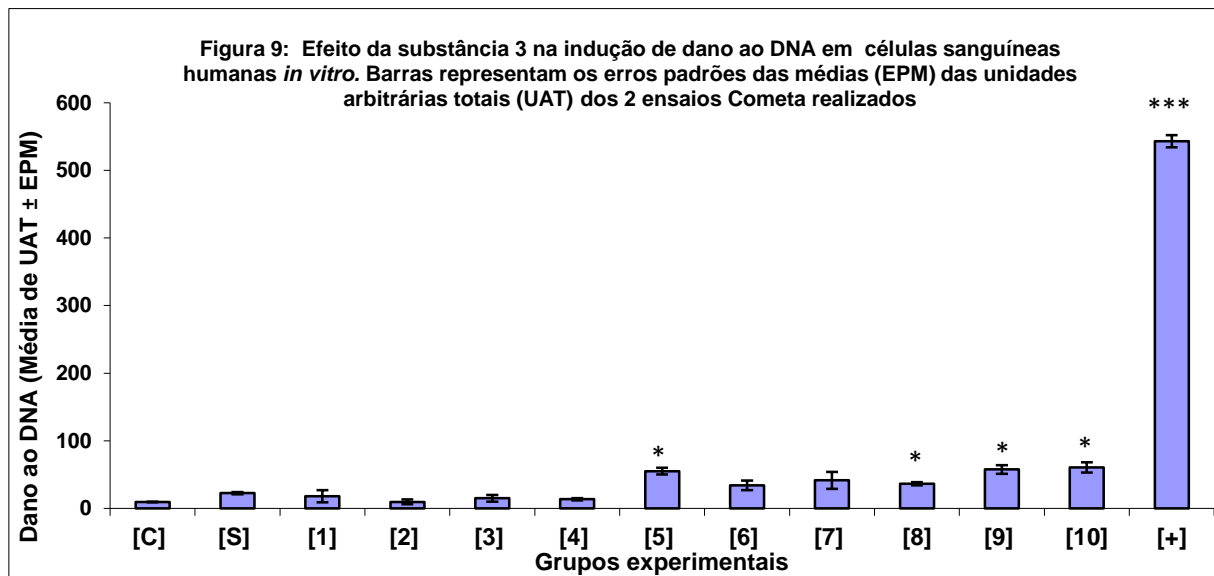
¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Ao se combinar os resultados do dano ao DNA em UAT nos dois ensaios Cometa independentes realizados verificou-se que o tratamento das células sanguíneas humanas com a substância 3 na faixa de concentrações de 149 μM a 10.000 μM induziu dano significativo ao DNA ($p < 0,05$) na concentração de 977 μM e nas três maiores concentrações testadas (4.000, 6.400 e 10.000 μM) quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular. O Quadro 12 e a Figura 9 mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média nos dois ensaios para as dez concentrações da substância 3, para os controles negativos (DMSO 5% e controle) e controle positivo (MMS 160 μM).

Quadro 12: Ensaio Cometa da substância 3 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados

Grupos	Média (UAT)	Erro padrão da média (UAT)	Teste <i>t</i> (p) ¹
Controles:			
Controle celular	9,50	0,50	-
Controle solvente (DMSO 5%)	22,50	1,50	-
Concentrações: substância 3			
149 μ M	18,00	9,00	0,335
238 μ M	9,50	3,50	0,038
382 μ M	15,00	5,00	0,144
610 μ M	13,50	1,50	0,026
977 μ M	55,00	5,00	0,012 *
1.562 μ M	34,00	7,00	0,125
2.500 μ M	41,50	12,50	0,135
4.000 μ M	36,50	2,50	0,020 *
6.400 μ M	57,50	6,50	0,017 *
10.000 μ M	60,50	7,50	0,019 *
Controle Positivo:			
MMS 160 μ M ²	543,00	9,00	0,0001 ***

¹Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. ²Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.



[C] Controle [S]. Controle-solvente DMSO 5%. Concentrações da substância 3: [1] 149 μ M, [2] 238 μ M, [3] 382 μ M, [4] 610 μ M, [5] 977 μ M, [6] 1.562 μ M, [7] 2.500 μ M, [8] 4.000 μ M, [9] 6.400 μ M, [10] 10.000 μ M. [+] Metanosulfonato de metila 160 μ M. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular

4.3.2 Ensaio de Micronúcleo

A substância 3 em DMSO 5% não foi citotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* (tratamento: 4h) nas concentrações de 150 μM e 4.000 μM quando medida pelo IPBC e nas concentrações de 150 μM , 640 μM e 4.000 μM quando medida pelo IR (Quadro 13). A citotoxicidade da substância 3 foi constatada em três concentrações (640 μM , 1.600 μM e 10.000 μM), evidenciada, respectivamente, pela diminuição do IPBC de 4%, 19% e 36% e em duas concentrações (1.600 μM e 10.000 μM), respectivamente, pela diminuição do IR de 5% e 22% quando comparados ao controle-solvente.

A partir dos resultados de citotoxicidade, todas as concentrações da substância 3 foram consideradas para análise quanto ao número de células micronucleadas por 2000 células binucleadas, pois as maiores reduções de IPBC (36 %) e de IR (22%) em relação ao controle-solvente ocorreram na concentração de 10.000 μM , abaixo do valor limite de 50% (OECD, 2014).

A substância 3 não induziu aumento significativo ($p > 0,1$) de formação de micronúcleos em células sanguíneas humanas *in vitro* na faixa de concentrações testada (150 μM a 10.000 μM) quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. Os controles positivos MMC 0,5 $\mu\text{g/mL}$, MMC 1,0 $\mu\text{g/mL}$ não induziram formação de células micronucleadas em células binucleadas ($p > 0,1$) em relação ao controle celular (Quadro 13). Conclui-se que a substância 3 não induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro*.

Quadro 13: Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese da substância 3 em células sanguíneas humanas.

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS/500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		ENSAIO DE MICRONÚCLEO		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC ¹	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR ²	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)	TESTE QUI-QUADRADO (p) ³	
Controles										
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
Controle Celular	410	86	4	1,188	-	-	-	16	32	-
								NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
Controle Solvente (DMSO 5%)	392	97	11	1,238	-	-	-	25		-
Concentrações Substância 3										
150 µM	349	147	4	1,310	-30%	151%	-51%	20		P=0,549
640 µM	389	108	3	1,228	4%	111%	-11%	8		P=0,005
1.600 µM	406	92	2	1,192	19%	95%	5%	20		P=0,549
4.000 µM	334	162	4	1,340	-43%	167%	-67%	24		P=1,000
10.000 µM	424	76	0	1,152	36%	78%	22%	36		P=0,197
Controle positivo										
MMC ⁴ 0,5 µg/mL	427	73	0	1,146	22%	85%	15%	35		P=0,805
MMC ⁴ 1,0 µg/mL	416	78	6	1,180	4%	91%	9%	38		P=0,547
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL ⁵ 0,02 µg/mL	455	37	8	1,106	44%	43%	57%	7	2	P= 0,060 (MONONUCLEADA) P= <0,0001 (BINUCLEADAS)

¹Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese (indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B. ² Índice de replicação, indica a proporção de ciclos de divisão celular completos. ³ Valores de p no teste do Qui-Quadrado. ⁴ Mitomicina C. ⁵ Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina). Pelo teste de Qui-Quadrado, ** significa aumento de células micronucleadas altamente significativo (p<0,01) em relação ao controle-solvente.

4.3.3 Ensaio Cometa e micronúcleo *in vitro* da substância 3 – contextualização com os dados da literatura.

A substância 3 sintetizada por Boechat e colaboradores (2001) mostrou moderada atividade em formas tripomastigotas de *T.cruzi*. A concentração de 0,3 mg/mL foi letal para 100% dos parasitos de *T.cruzi*. A substância 3 difere do MGZ por apresentar o grupo nitro na posição 4 do anel imidazólico e por possuir um anel triazólico com um substituinte CF₃ acrescido de NH como grupo espaçador.

A substância 3, quando testada em células sanguíneas (linfócitos) humanas, durante 2h, na faixa de concentrações de 149 µM a 10.000 µM induziu significativa quebra de fita de DNA ($p < 0,05$) na concentração de 977 µM e nas três maiores concentrações (4.000, 6.400 e 10.000 µM) quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O dano ao DNA não foi associado à citotoxicidade, pois a menor concentração (977 µM) não induziu letalidade celular e as três maiores concentrações (4.000, 6.400 e 10.000 µM) causaram níveis muito reduzidos e aceitáveis de citotoxicidade inferiores a 30% (2%, 1% e 2% respectivamente).

Quando comparado ao MGZ, a alteração da estrutura molecular não aboliu o efeito de indução de quebra de fita de DNA. O efeito sobre o DNA foi praticamente o mesmo para ambas substâncias. O dano ao DNA nas células sanguíneas foi induzido pelas 3 maiores concentrações (4.000, 6.400 e 10.000 µM) da substância 3 e pelas 2 maiores concentrações (6.400 µM e 10.000 µM) do MGZ. No entanto, a menor concentração genotóxica da substância 3 (977 µM) foi cerca de 1,6 X inferior à menor concentração genotóxica do MGZ (1562 µM).

No ensaio de micronúcleo, a substância 3 não induziu ($p > 0,1$) quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro*. A alteração da posição do grupo nitro da posição 5 do anel imidazólico no MGZ para a posição 4 na substância 3 e a mudança do anel tiodiazólico para o anel triazólico com um substituinte CF₃ acrescido de NH como grupo espaçador aboliu o efeito clastogênico (quebras cromossômicas) e/ou aneugênico (perda ou ganho de cromossomos) do MGZ. Quanto à citotoxicidade, em células sanguíneas (linfócitos) quando comparada ao MGZ, tal alteração também causou redução de citotoxicidade, pois a substância 3 causou nas concentrações de 1600 µM e 10.000 µM, respectivamente, reduções de

IR de 5% e de 22% em relação ao controle-solvente, inferiores aos valores de IR de 31% e 62%.

4.4 SUBSTÂNCIA 4

4.4.1 Ensaio Cometa

A substância 4 (Figura 1) de PM 193 e fórmula química $C_7H_7N_5O_2$ foi testada em células sanguíneas humanas *in vitro*, no ensaio de citotoxicidade mediado pelo DAF e BrEt e em dois ensaios Cometa (ensaio Cometa 1, ensaio Cometa 2) empregando-se nove concentrações da substância na faixa de 149 μ M a 6400 μ M em DMSO 5%, que corresponde ao controle solvente.

No ensaio de citotoxicidade, a substância 4 nas concentrações de 149, 382 a 1562 μ M, 4000 e 6400 μ M em DMSO 5% não induziu decréscimo de viabilidade celular quando comparado ao valor de 2% para o controle, DMSO 5% (Tabela 4). Apenas as concentrações de 238 μ M e de 2500 μ M apresentaram respectivamente, 4 e 6% de decréscimos de viabilidade celular e, portanto, superior ao valor do controle DMSO 5%, porém não houve um aumento de citotoxicidade nas concentrações subsequentes. As nove concentrações testadas apresentaram níveis aceitáveis de citotoxicidade, ou seja, não induziram valores superiores a 30% de decréscimo de viabilidade celular quando comparados ao DMSO 5% sendo, conseqüentemente empregadas no ensaio Cometa.

Tabela 4: Ensaio de citotoxicidade da substância 4 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: 2 h a 37^o C

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controles:	
Controle celular	0%
Controle-solvente (DMSO 5%)	2%
Concentrações:substância 4	
149 μ M	0%
238 μ M	4%
382 μ M	0%
610 μ M	0%
977 μ M	2%
1.562 μ M	0%
2.500 μ M	6%
4.000 μ M	0%
6.400 μ M	0%

O Quadro14 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o primeiro ensaio Cometa em células sanguíneas humanas *in vitro*. A substância não foi genotóxica, não induzindo aumento da migração de DNA estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na faixa de concentrações testada (149 μM a 6400 μM) quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico bem evidente e altamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle.

Quadro 14: Ensaio Cometa 1 da substância 4 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle	95,5	2,5	0,0	2,0	17
Controle solvente (DMSO 5%)	93,5	5,5	0,0	1,0	17
Concentrações Substância 4					
149 μM	95,0	3,5	1,0	0,5	14
238 μM	96,0	4,0	0,0	0,0	8
382 μM	95,5	3,0	0,0	1,5	15
610 μM	96,0	3,0	1,0	0,0	10
977 μM	96,0	3,5	0,5	0,0	9
1.562 μM	93,0	5,0	1,5	0,5	19
2.500 μM	89,5	9,5	0,5	0,5	24
4.000 μM	92,5	7,0	0,5	0,0	16
6.400 μM	87,0	12,0	0,5	0,5	29
Controle Positivo					
MMS 160 μM ¹	0,0	16,0	13,0	71,0	510 **

¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos ** indicam, aumento de migração de DNA altamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle celular.

O Quadro15 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o segundo ensaio Cometa em células sanguíneas humanas *in vitro*. Observou-se que em 2 concentrações testadas da substância 4 (382 e 4.000 μM), o efeito genotóxico foi significativo, induzindo aumento da migração do DNA significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao DMSO 5%. O controle positivo, MMS 160 μM induziu efeito genotóxico extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 15: Ensaio Cometa 2 da substância 4 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	94,5	4,5	0,5	0,5	14
Controle solvente (DMSO 5%)	95,5	4,0	0,0	0,5	11
Concentrações Substância 4					
149 µM	92,0	6,5	0,5	1,0	21
238 µM	90,0	8,5	1,0	0,5	24
382 µM	86,5	11,5	0,5	1,5	34 *
610 µM	85,5	13,0	0,5	1,0	34
977 µM	84,0	12,0	2,0	2,0	44
1.562 µM	83,0	12,5	2,5	2,0	47
2.500 µM	83,5	14,0	2,0	0,5	39
4.000 µM	85,5	13,5	0,5	0,5	32 *
6.400 µM	89,0	9,0	1,0	1,0	28
Controle Positivo					
MMS 160 µM [†]	0,0	14,0	10,0	76,0	524 ***

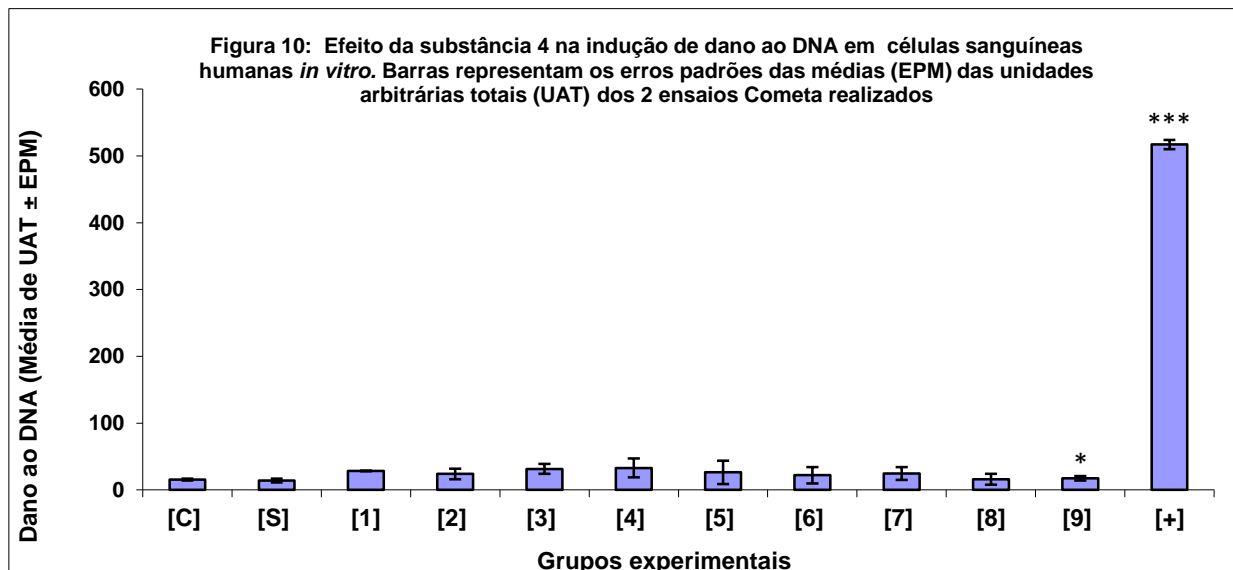
[†]Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quando se combinaram os dois ensaios independentes realizados, verificou-se que o tratamento das células sanguíneas humanas com a substância 4 na faixa de concentrações de 149 µM a 6.400 µM, apenas induziu dano significativo ao DNA ($p < 0,05$) na mais alta concentração testada (6400 µM) quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 µM induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular. O Quadro 16 e a Figura 10 mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média nos dois ensaios para as nove concentrações da substância 4, para os controles negativos (DMSO 5% e controle celular) e controle positivo (MMS 160 µM).

Quadro 16: Ensaio Cometa da substância 4 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades arbitrárias totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados

Grupos	Média (UAT)	Erro padrão da média (UAT)	Teste t (p) ¹
Controles:			
Controle celular	15,50	1,50	-
Controle solvente (DMSO 5%)	14,00	3,00	-
Concentrações: Substância 4			
149 μ M	17,50	3,50	0,263
238 μ M	16,00	8,00	0,418
382 μ M	24,50	9,50	0,201
610 μ M	22,00	12,00	0,292
977 μ M	26,50	17,50	0,277
1.562 μ M	33,00	14,00	0,158
2.500 μ M	31,50	7,50	0,081
4.000 μ M	24,00	8,00	0,181
6.400 μ M	28,50	0,50	0,021 *
Controle Positivo:			
MMS 160 μ M ²	517,00	7,00	0,0001 ***

¹Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. ²Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.



[C] Controle [S]. Controle-solvente DMSO 5%. Concentrações da substância 4: [1] 149 μ M, [2] 238 μ M, [3] 382 μ M, [4] 610 μ M, [5] 977 μ M, [6] 1.562 μ M, [7] 2.500 μ M, [8] 4.000 μ M, [9] 6.400 μ M, [10] 10.000 μ M. [+] Metanosulfonato de metila 160 μ M. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular

4.4.2 Ensaio de Micronúcleo

A substância 4 em DMSO 5% não foi citotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* (tratamento: 4h) nas três menores concentrações (150 µM, 640 µM e 1.600 µM) e citotóxica nas duas maiores concentrações (4.000 µM e 10.000 µM) evidenciada pela diminuição do IPBC e IR quando comparados ao controle-solvente. A diminuição dos dois índices foi concentração-dependente constatando-se uma inibição do crescimento celular (% de atividade citostática) de 47% e 72%, respectivamente nas concentrações de 4.000 µM e 10.000 µM relacionado ao IPBC e de 44% e 76% de atividade citostática nas concentrações de 4.000 µM e 10.000 µM relacionados ao IR (Quadro 17).

A partir dos resultados de citotoxicidade definiu-se 4.000 µM como a concentração máxima da substância 4 a ser analisada quanto ao número de células micronucleadas por 2000 células binucleadas, pois na concentração de 10.000 µM houve uma redução de 72% de crescimento celular quando medido pelo IPBC e de 76% do IR em relação ao controle DMSO 5%, acima do valor limite de 50% (OECD, 2014).

A substância 4 não induziu aumento significativo de formação de micronúcleos em células sanguíneas humanas *in vitro* na faixa de concentrações analisada (150 µM a 4.000 µM) quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. O controle positivo (MMC 0,5 µg/mL) não induziu aumento de formação de células micronucleadas em células binucleadas em relação ao controle celular ($p > 0,1$). O controle positivo (MMC 1,0 µg/mL) também não induziu aumento de formação de células micronucleadas em células binucleadas em relação ao controle celular ($p > 0,1$), apesar de ter causado diminuição de 63% do IPBC e redução de 65% do IR em relação ao controle celular, acima do valor limite de 50% (OECD, 2014). O controle positivo, COL 0,02 µg/mL, não foi analisado quanto à formação de células micronucleadas em células mononucleadas e binucleadas devido à indução de reduções de 52% de IPBC e de 54% do IR em relação ao controle celular (Quadro 17). Conclui-se que a substância 4 não induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro*.

Quadro 17: Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese da substância 4 em células sanguíneas humanas.

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS/500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		ENSAIO DE MICRONÚCLEO		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC ¹	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR ²	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)	TESTE QUI QUADRADO (p) ³	
Controles										
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
Controle Celular	417	74	9	1,184	-	-	-	30	32	-
								NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
Controle Solvente (DMSO 5%)	443	50	7	1,128	-	-	-	35		-
Concentrações Substância 4										
150 µM	417	74	9	1,184	-44%	148%	-48%	32		P=0,805
640 µM	416	66	18	1,204	-59%	132%	-32%	12		P=0,001
1.600 µM	438	57	5	1,134	-5%	114%	-14%	16		P=0,011
4.000 µM	469	28	3	1,068	47%	56%	44%	12		P=0,001
10.000 µM ⁴	485	12	3	1,036	72%	24%	76%	-		-
Controle positivo										
MMC ⁵ 0,5 µg/mL	458	41	1	1,086	53%	55%	45%	28		P=0,696
MMC ⁵ 1,0 µg/mL	470	26	4	1,068	63%	35%	65%	37		P=0,627
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL ⁶ 0,02 µg/mL	461	34	5	1,088	52%	46%	54%	-	-	-

¹Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese (indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B). ²Índice de replicação, indica a proporção de ciclos de divisão celular completos. ³Valores de p no teste do Qui-Quadrado. ⁴Análise de micronúcleos não considerada em 10.000 µM devido à indução de inibição de crescimento celular superior a 50%. ⁵Mitomomicina C. ⁶Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina). Análise de micronúcleos não considerada devido a indução de inibição de crescimento celular superior a 50%.

4.4.3 Ensaio Cometa e micronúcleo *in vitro* da substância 4 – contextualização com os dados da literatura.

A substância 4 sintetizada por Boechat e colaboradores (2001) mostrou moderada atividade tripanomicida em formas tripomastigotas de *T.cruzi*. A concentração de 2,5 mg/mL foi letal para 100% dos parasitos de *T.cruzi* e a $CI_{50} = 120 \mu\text{M}$ foi determinada para *T.cruzi*. A substância 4 difere do MGZ por apresentar o grupo nitro na posição 4 do anel imidazólico e pela substituição do anel tiodiazólico pelo anel pirazólico. A substância 4 se mostrou menos ativa contra o *T. cruzi* do que a substância 3 (Boechat et al., 2001).

A substituição do anel tiodiazólico do MGZ pelo anel pirazólico segundo Walsh e colaboradores (1987) pode melhorar a atividade tripanomicida e reduzir a toxicidade inespecífica.

A substância 4, testada durante 2h na faixa de concentrações de $149 \mu\text{M}$ a $6.400 \mu\text{M}$, apenas induziu quebra de fita do DNA ($p < 0,05$) em células sanguíneas humanas na mais alta concentração testada ($6.400 \mu\text{M}$) quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O dano ao DNA não foi associado à citotoxicidade, pois esta concentração ($6400 \mu\text{M}$) não induziu letalidade celular. A mudança do grupo nitro da posição 5 do anel imidazólico para a posição 4 e a substituição do anel tiodiazólico pelo anel pirazólico não aboliu o efeito genotóxico, porém diminuiu o efeito genotóxico quando comparado ao MGZ, pois o MGZ também induziu quebra de fita de DNA em $1562 \mu\text{M}$, em concentração 4x menor. A substância 4 mostrou também atividade genotóxica no teste de Ames na cepa TA100 de *Salmonella typhimurium* somente na mais alta concentração ($50 \mu\text{g/mL}$), com e sem mistura S9 e mostrou atividade citotóxica para TA98 ($50 \mu\text{g/mL}$), TA100 ($1,0 \mu\text{g/mL}$ a $50 \mu\text{g/mL}$) e TA1535, na faixa de $1,0 \mu\text{g/mL}$ a $50 \mu\text{g/mL}$ com mistura S9 (MELLO et al., 2013).

No ensaio de micronúcleo, a substância 4, na faixa de $150 \mu\text{M}$ a $4.000 \mu\text{M}$ não induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro*. A alteração da posição do grupo nitro da posição 5 do anel imidazólico no MGZ para a posição 4 e a substituição do anel tiodiazólico presente no MGZ pelo anel pirazólico aboliu o efeito clastogênico (quebras cromossômicas) e/ou aneugênico (perda ou ganho de cromossomos) do MGZ. Estes resultados foram diferentes dos obtidos por Mello e colaboradores (2013). Os autores, porém utilizaram no teste de micronúcleo *in vitro*,

outro tipo celular, células RAW 264,7 de macrófago que foram tratadas durante 24h, (período de tempo 6X maior) com três concentrações da substância 4 (1,0, 10 e 100 µg/mL), Houve um aumento na formação de MNs nas 2 maiores concentrações com aproximadamente o mesmo número de células micronucleadas (Mello et al, 2013).

Quanto à citotoxicidade da substância 4, houve decréscimo de IR nas duas mais altas concentrações (4.000 µM: 44% e 1000 µM: 78%) comparável à redução de IR para o MGZ (4.000 µM: 51% e 10,000 µM: 62%) ambos em relação ao controle solvente. Porém, o MGZ foi mais citotóxico do que a substância 4, pois também induziu 31% de redução de IR em concentração de 1600 µM, concentração cerca de 2,5X menor do que a menor concentração com efeito tóxico na substância 4.

4.5 SUBSTÂNCIA 5

4.5.1 Ensaio Cometa

A substância 5 (Figura 1) de PM 193 e fórmula química $C_7H_7N_5O_2$ foi testada em células sanguíneas humanas *in vitro*, no ensaio de citotoxicidade mediado pelo DAF e BrEt e em dois ensaios Cometa (ensaio Cometa 1, ensaio Cometa 2) empregando-se nove concentrações da substância na faixa de 149 µM a 6400 µM em DMSO 5%, que corresponde ao controle solvente.

No ensaio de citotoxicidade, a substância 5, nas duas maiores concentrações testadas (4000 µM e 6400 µM), bem como em 238 µM e 1562 µM não induziu decréscimo de viabilidade celular quando comparado ao valor de 0 % para o controle, DMSO 5% (Tabela 5). As demais concentrações da substância 5 apresentaram de 1 a 3 % de decréscimos de viabilidade celular e, portanto, levemente superior ao valor referente ao DMSO 5%. As nove concentrações da substância 5 apresentaram níveis aceitáveis de citotoxicidade, ou seja, não induziram valores superiores a 30% de decréscimo de viabilidade celular quando comparados ao DMSO 5% sendo, conseqüentemente empregadas no ensaio Cometa.

Tabela 5: Ensaio de citotoxicidade da substância 5 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: 2 h a 37^o C

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controles:	
Controle celular	1%
Controle-solvente (DMSO 5%)	0%
Concentrações:substância 5	
149 µM	2%
238 µM	0%
382 µM	3%
610 µM	2%
977 µM	2%
1.562 µM	0%
2.500 µM	1%
4.000 µM	0 %
6.400 µM	0%

O Quadro 18 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o primeiro ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. No primeiro ensaio realizado, a substância 5, induziu dano altamente significativo ($p < 0,05$) nas concentrações de 149, 382, 610 e 1562 µM quando comparado ao DMSO 5% não acompanhado de aumento de dano nas três maiores concentrações subsequentes. O controle positivo, MMS 160 µM, induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 18: Ensaio Cometa 1 da substância 5 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	86,0	9,5	4,5	0,0	37
Controle solvente (DMSO 5%)	88,0	9,0	3,0	0,0	30
Concentrações Substância 5					
149 µM	67,0	22,5	3,0	7,5	102 *
238 µM	68,0	22,5	4,0	5,5	94
382 µM	56,5	31,5	5,5	6,5	124 *
610 µM	76,0	17,0	3,0	4,0	70 *
977 µM	80,0	15,0	5,0	0,0	50
1.562 µM	71,5	18,5	5,5	4,5	86 *
2.500 µM	84,0	11,5	3,5	1,0	43
4.000 µM	77,5	14,5	2,5	5,5	72
6.400 µM	84,0	10,0	5,5	0,5	45
Controle Positivo					
MMS 160 µM ¹	0,0	8,5	15,5	76,0	535 ***

¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student*, os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

O Quadro 19 mostra o dano ao DNA expresso em porcentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o segundo ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. No segundo ensaio, as concentrações de 238, 610 e 977 μM induziram significativo dano ao DNA ($p < 0,05$), também não acompanhado de aumento de efeito nas quatro maiores concentrações subsequentes. O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 19: Ensaio Cometa 2 da substância 5 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades Arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano no DNA (%)				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	95,5	4,5	0,0	0,0	9
Controle solvente (DMSO 5%)	96,0	3,5	0,0	0,5	10
Concentrações Substância 5					
149 μM	93,0	6,0	0,0	1,0	18
238 μM	87,5	11,5	1,0	0,0	27 *
382 μM	93,5	5,5	0,5	0,5	16
610 μM	90,5	9,5	0,0	0,0	19 *
977 μM	91,5	8,5	0,0	0,0	17 *
1.562 μM	90,5	7,5	0,5	1,5	26
2.500 μM	97,0	3,0	0,0	0,0	6
4.000 μM	96,5	3,5	0,0	0,0	7
6.400 μM	95,0	4,5	0,5	0,0	11
Controle Positivo					
MMS 160 μM [†]	0,0	2,0	13,0	85,0	566 ***

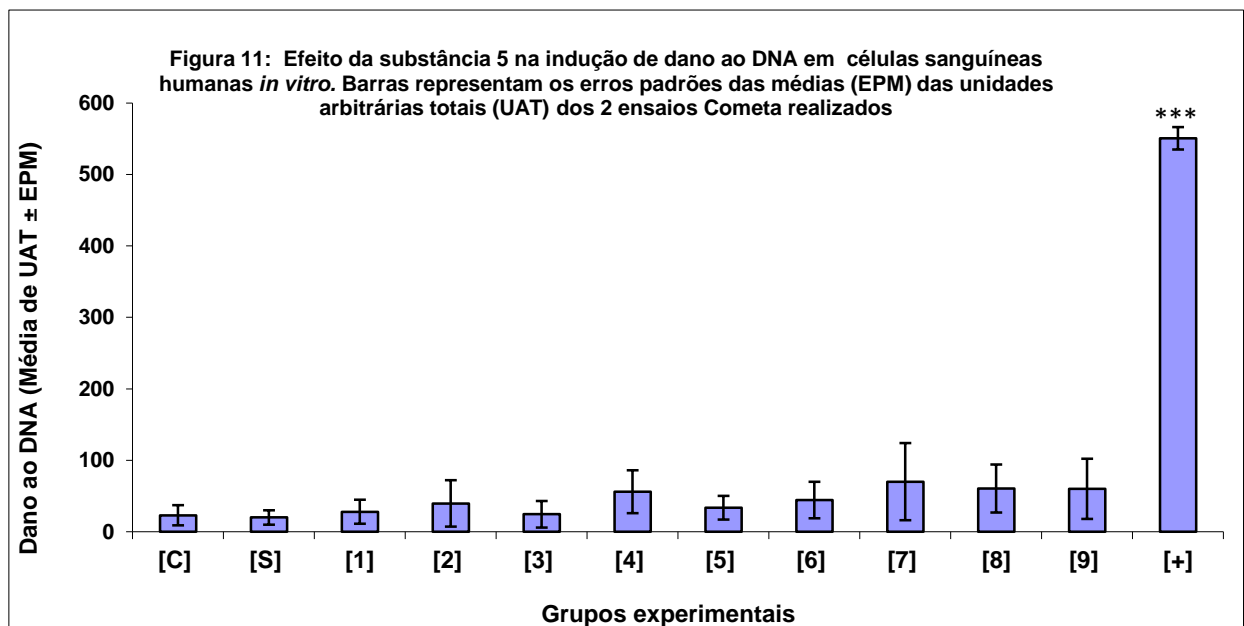
[†]Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quando se combinaram os dois ensaios independentes realizados, verificou-se que o tratamento das células sanguíneas humanas com a substância 5 na faixa de concentrações de 149 μM a 6.400 μM , não induziu dano significativo ao DNA ($p < 0,05$) quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle (Quadro 20). O Quadro 20 e a Figura 11 mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média nos dois ensaios para as nove concentrações da substância 5, para os controles negativos (DMSO 5% e controle celular) e controle positivo (MMS 160 μM).

Quadro 20: Ensaio Cometa da substância 5 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades arbitrárias totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados

Grupos	Média (UAT)	Erro padrão da média (UAT)	Teste <i>t</i> (p) ¹
Controles:			
Controle celular	23,00	14,00	-
Controle solvente (DMSO 5%)	20,00	10,00	-
Concentrações: Substância 5			
149 μ M	60,00	42,00	0,226
238 μ M	60,50	33,50	0,183
382 μ M	70,00	54,00	0,229
610 μ M	44,50	25,50	0,233
977 μ M	33,50	16,50	0,278
1.562 μ M	56,00	30,00	0,186
2.500 μ M	24,50	18,50	0,425
4.000 μ M	39,50	32,50	0,312
6.400 μ M	28,00	17,00	0,362
Controle positivo:			
MMS 160 μ M ²	550,50	15,50	0,001 ***

¹Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. ²Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* *** indicam aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.



[C] Controle [S]. Controle-solvente DMSO 5%. Concentrações da substância 5: [1] 149 μ M, [2] 238 μ M, [3] 382 μ M, [4] 610 μ M, [5] 977 μ M, [6] 1.562 μ M, [7] 2.500 μ M, [8] 4.000 μ M, [9] 6.400 μ M. [+] Metanosulfonato de metila 160 μ M. Pelo teste t de *Student* os asteriscos *** indicam, aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular

4.5.2 Ensaio de Micronúcleo

A substância 5 em DMSO 5% não foi citotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* (tratamento: 4h) nas duas menores concentrações (150 µM, 640 µM) e citotóxica nas concentrações 1.600 µM, 4.000 µM e 10.000 µM evidenciada pela diminuição dos respectivos IPBC de 80%, 41% e 59% e pela redução, respectivamente de 77%, 32% e 57% de IR quando comparados ao controle-solvente (Quadro 21).

A partir dos resultados de citotoxicidade definiu-se 4.000 µM como a concentração máxima da substância 5 a ser analisada quanto ao número de células micronucleadas por 2000 células binucleadas, pois nesta concentração houve uma redução de 41% do IPBC e diminuição de 32% do IR em relação ao controle DMSO 5%, abaixo do valor limite de 50% (OECD, 2014). Na concentração de 10.000 µM houve uma redução de 59 % de crescimento celular quando medido pelo IPBC e de 57% do IR em relação ao controle DMSO 5%, acima do valor limite de 50%.

A substância 5 induziu aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de formação de micronúcleos em células sanguíneas humanas *in vitro* na concentração de 4.000 µM quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. Adicionalmente, o aumento de indução de formação de micronúcleos foi concentração-dependente ($p < 0,01$) quando avaliado pelo teste Qui-quadrado para análise de tendência linear ($p = 0,0081$). O controle positivo MMC 0,5 µg/ml e MMC 1,0 µg/ml, induziram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de células micronucleadas em células binucleadas em relação ao controle celular (Quadro 21). O controle positivo, COL 0,02 µg/mL, não foi analisado quanto à formação de células micronucleadas em células mononucleadas e binucleadas do sangue devido à indução de reduções de 56% de IPBC e de 60% do IR em relação ao controle celular (Quadro 21). Conclui-se que a substância 5 induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro*.

Quadro 21: Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese da substância 5 em células sanguíneas humanas.

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS/500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		ENSAIO DE MICRONÚCLEO		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC ¹	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR ²	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)		TESTE QUI-QUADRADO (p) ³
Controles										
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
Controle Celular	422	70	8	1,172	-	-	-	32	32	-
								NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
Controle Solvente (DMSO 5%)	462	35	3	1,082	-	-	-	17		-
Concentrações Substância 5										
150 µM	423	74	3	1,160	-95%	211%	-111%	9		P=0,168
640 µM	419	77	4	1,170	-107%	220%	-120%	10		P=0,247
1.600 µM ⁴	492	08	0	1,016	80%	23%	77%	-		-
4.000 µM	476	24	0	1,048	41%	68%	32%	33		P=0,033 *
10.000 µM ⁴	484	15	1	1,034	59%	43%	57%	-		-
Controle positivo										
MMC ⁵ 0,5 µg/mL	391	100	9	1,236	-37%	143%	-43%	52		P=0,036 *
MMC ⁵ 1,0 µg/mL	449	50	1	1,104	40%	71%	29%	56		P=0,013 *
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL ⁶ 0,02 µg/mL	467	28	5	1,076	56%	40%	60%	32	40	P=0,341

¹Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese (indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B). ²Índice de replicação, indica a proporção de ciclos de divisão celular completos. ³Valores de p no teste do Qui-Quadrado. ⁴Análise de micronúcleos não considerada em 1.600 µM e 10.000 µM devido à indução de inibição de crescimento celular superior a 50%. ⁵Mitomicina C. ⁶Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina): Análise de micronúcleos em células mononucleadas e binucleadas não considerada devido à indução de inibição de crescimento celular superior a 50%. Pelo teste de Qui-Quadrado, *significa aumento de células micronucleadas estatisticamente significativo (p<0,05) na concentração 4.000 µM em relação ao controle solvente e nas duas concentrações de MMC em relação ao controle celular.

4.5.3 Ensaio Cometa e micronúcleo *in vitro* da substância 5 – contextualização com os dados da literatura.

A substância 5 sintetizada por Quaresma (2015) apresentou baixa atividade tripanomicida contra as formas tripomastigotas de *T.cruzi* com $CI_{50} > 2000 \mu M$. A substância 5 contém o núcleo imidazólico e o núcleo nitroimidazólico (grupo nitro na posição 4).

A substância 5, testada na faixa de concentrações de $149 \mu M$ a $6.400 \mu M$, durante 2h, não induziu quebra de fita do DNA ($p > 0,05$) quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). A substituição do núcleo tiodiazólico do MGZ pelo imidazólico e a mudança da posição do grupo nitro da posição 5 para a posição 4 no núcleo nitroimidazólico aboliu o efeito de indução de quebras de fita de DNA pelo MGZ. A modificação estrutural acarretou uma queda acentuada da atividade tripanomicida do MGZ de $IC_{50}=9,9 \mu M$ (CARVALHO et al., 2007) para $IC_{50}= > 2000 \mu M$ (QUARESMA, 2015).

No ensaio de micronúcleo, a substância 5, na faixa de $150 \mu M$ a $4000 \mu M$, induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos ($p < 0,05$) em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro* na concentração de $4.000 \mu M$ quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. A alteração estrutural não aboliu o efeito clastogênico e/ou aneugênico da substância 5. Porém, o efeito mutagênico induzido pela substância 5, foi menos acentuado do que o produzido pelo MGZ que, além da concentração de $4.000 \mu M$ induziu efeito clastogênico e/ou aneugênico altamente significativo ($p < 0,01$) em concentração inferior a $4000 \mu M$ ($1600 \mu M$), 2,5X inferior à menor concentração positiva da substância 5.

4.6 SUBSTÂNCIA 6

4.6.1 Ensaio Cometa

A substância 6 (Figura 1) de PM 194 e fórmula química $C_6H_6N_6O_2$ foi testada em células sanguíneas humanas *in vitro*, no ensaio de citotoxicidade mediado pelo DAF e BrEt e em dois ensaios Cometa (ensaio Cometa 1, ensaio Cometa 2)

empregando-se dez concentrações da substância na faixa de 149 µM a 10.000 µM em DMSO 5%, que corresponde ao controle solvente.

No ensaio de citotoxicidade, a substância 6 testada na faixa de concentrações de 149 a 10.000 µM em DMSO 5% após período de tratamento de 2h a 37°C, não foi citotóxica em células sanguíneas humanas não induzindo decréscimo de viabilidade celular. O controle-solvente (DMSO 5%) também não induziu morte celular. Desta forma, todas as dez concentrações de 6 foram empregadas no ensaio Cometa em células sanguíneas humanas (tabela 6).

Tabela 6: Ensaio de citotoxicidade da substância 6 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: 2 h a 37°C

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controles:	
Controle celular	0%
Controle-solvente (DMSO 5%)	0%
Concentrações:substância 6	
149 µM	0%
238 µM	0%
382 µM	0%
610 µM	0%
977 µM	0%
1.562 µM	0%
2.500 µM	0%
4.000 µM	0%
6.400 µM	0%
10.000 µM	0%

O Quadro 22 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o primeiro ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. No primeiro ensaio, a substância 6, somente na mais alta concentração testada de 10.000 µM, induziu dano significativo ao DNA ($p < 0,05$) quando comparada ao controle DMSO 5%. O controle positivo, MMS 160 µM, induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 22: Ensaio Cometa 1 da substância 6 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	87,5	12,5	0,0	0,0	25
Controle solvente (DMSO 5%)	90,0	9,5	0,5	0,0	21
Concentrações Substância 6					
149 µM	96,5	3,5	0,0	0,0	7
238 µM	72,5	2,0	0,0	0,5	7
382 µM	95,5	4,0	0,0	0,5	11
610 µM	94,5	5,5	0,0	0,0	11
977 µM	91,5	8,0	0,0	0,5	19
1.562 µM	87,5	12,0	0,0	0,5	27
2.500 µM	83,0	16,5	0,0	0,5	36
4.000 µM	89,5	9,5	0,5	0,5	24
6.400 µM	56,5	42,0	1,0	0,5	91
10.000 µM	45,0	55,0	0,0	0,0	110 *
Controle Positivo					
MMS 160 µM [†]	0,0	0,0	1,5	98,5	597 ***

[†]Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

O Quadro 23 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o segundo ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. No segundo ensaio Cometa, a substância 6 induziu dano altamente significativo ao DNA ($p < 0,01$) em cinco concentrações (610 µM e 2.500 µM a 10.000 µM) e dano significativo ($p < 0,05$) em 977 µM, quando comparado ao controle DMSO 5%. O controle positivo, MMS 160 µM, induziu efeito genotóxico bem evidente em relação ao controle celular.

Quadro 23: Ensaio Cometa 2 da substância 6 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA e dano ao DNA em Unidades arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle celular	87,0	13,0	0,0	0,0	26
Controle solvente (DMSO 5%)	88,5	11,0	0,0	0,5	25
Concentrações Substância 6					
149 µM	86,5	13,5	0,0	0,0	27
238 µM	86,5	13,5	0,0	0,0	27
382 µM	77,5	22,5	0,0	0,0	45
610 µM	82,5	17,0	0,0	0,5	37 **
977 µM	82,5	17,0	0,0	0,5	37 *
1.562 µM	67,5	32,0	0,0	0,5	67
2.500 µM	49,0	50,5	0,0	0,5	104 **
4.000 µM	70,5	28,5	0,0	1,0	63 **
6.400 µM	60,0	38,0	0,5	1,5	87 **
10.000 µM	63,5	34,5	1,0	1,0	79 **
Controle Positivo					
MMS 160 µM ¹	0,0	0,0	0,0	100,0	600

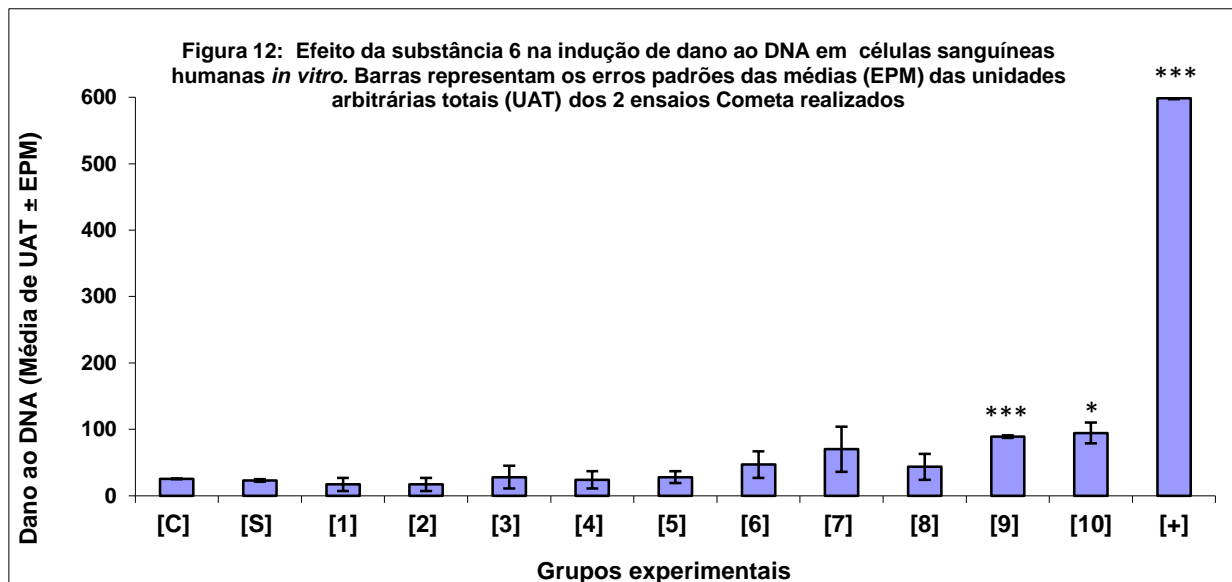
¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e ** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA altamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle celular.

Ao se combinar os dois ensaios Cometa realizados independentemente, verificamos que o tratamento pela substância 6 na faixa de concentrações de 149 a 4000 µM não induziu dano significativo ao DNA ($p > 0,1$) em relação ao controle-solvente DMSO 5% (Tabela 6). Porém nas duas maiores concentrações testadas de 6 (6.400 µM e 10.000 µM), detectou-se, respectivamente, dano ao DNA significativo ($p < 0,001$ e $p < 0,05$) quando comparado ao DMSO 5%. O controle positivo, MMS 160 µM induziu, efeito genotóxico extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular. O Quadro 24 e a Figura 12 mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média nos dois ensaios para as dez concentrações da substância 6, para os controles negativos (DMSO 5% e controle celular) e controle positivo (MMS 160 µM).

Quadro 24: Ensaio Cometa da substância 6 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades arbitrárias totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados

Grupos	Média (UAT)	Erro padrão da média (UAT)	Teste t (p) ¹
Controles:			
Controle celular	25,50	0,50	-
Controle solvente (DMSO 5%)	23,00	2,00	-
Concentrações: Substância 6			
149 μ M	17,00	10,00	0,308
238 μ M	17,00	10,00	0,308
382 μ M	28,00	17,00	0,399
610 μ M	24,00	13,00	0,473
977 μ M	28,00	9,00	0,321
1.562 μ M	47,00	20,00	0,177
2.500 μ M	70,00	34,00	0,151
4.000 μ M	43,50	19,50	0,203
6.400 μ M	89,00	2,00	0,001 ***
10.000 μ M	94,50	15,50	0,022 *
Controle positivo:			
MMS 160 μ M ²	598,50	1,50	0,000 ***

¹Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. ²Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle-solvente (Substância 6 - 6.400 μ M) e em relação ao controle celular para o MMS



[C] Controle [S] Controle-solvente DMSO 5%. Concentrações da substância 6: [1] 149 μ M, [2] 238 μ M, [3] 382 μ M, [4] 610 μ M, [5] 977 μ M, [6] 1.562 μ M, [7] 2.500 μ M, [8] 4.000 μ M, [9] 6.400 μ M, [10] 10.000 μ M. [+] Metanosulfonato de metila 160 μ M. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao ao controle solvente (Substância 6 - 6.400 μ M) e em relação ao controle celular para o MMS

4.6.2 Ensaio de Micronúcleo

A substância 6 em DMSO 5% não foi citotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* (tratamento: 4h) somente na concentração de 150 μM por não causar redução do IR da cultura quando comparado ao controle-solvente (Quadro 25).

As demais concentrações da substância 6 foram citotóxicas causando redução do IPBC e IR quando comparados ao controle-solvente. A diminuição dos dois índices foi concentração-dependente sendo que na maior concentração testada (10.000 μM) devido a alta citotoxicidade causada pela substância 6 não foi possível a determinação do IPBC e do IR.

A redução do IPBC de 23%, 46%, 86% e 90% em relação às culturas controle solvente foi constatada em culturas de células sanguíneas humanas tratadas respectivamente, com as concentrações de 150 μM , 640 μM , 1600 μM e 4.000 μM da substância 6. Comparativamente ocorreu redução de IR de 31%, 74% e 83% para as culturas tratadas com 640 μM , 1600 μM e 4.000 μM da substância 6.

A partir dos resultados de citotoxicidade definiu-se 640 μM como a concentração máxima da substância 6 a ser analisada quanto ao número de células micronucleadas por 2000 células binucleadas, pois nesta concentração houve uma redução de 46% do IPBC e 31% do IR, abaixo do valor limite de 50% (OECD, 2014).

A substância 6 não induziu aumento significativo de formação de micronúcleos em células sanguíneas humanas *in vitro* nas concentrações analisadas (150 μM e 640 μM) quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. MMC nas duas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e 1 $\mu\text{g/ml}$ não induziu aumento significativo de células micronucleadas em células binucleadas em relação ao controle celular. COL 0,02 $\mu\text{g/mL}$ não induziu aumento de células micronucleadas em células mononucleadas e em células binucleadas em relação ao controle celular (Quadro 25).

Conclui-se que a substância 6 não tem a capacidade de induzir quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro*.

Quadro 25: Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese da substância 6 em células sanguíneas humanas.

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS/500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		ENSAIO DE MICRONÚCLEO		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC ¹	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR ²	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)		TESTE QUI-QUADRADO (p) ³
Controles										
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
Controle Celular	431	54	15	1,168	-	-	-	24	40	-
								NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
Controle Solvente (DMSO 5%)	427	46	27	1,2	-	-	-	36		-
Concentrações Substância 6										
150 µM	427	69	4	1,154	23%	150%	-50%	20		P=0,043
640 µM	457	32	11	1,108	46%	69%	31%	16		P=0,080
1.600 µM ⁴	487	12	1	1,028	86%	26%	74%	-		-
4.000 µM ⁴	491	8	1	1,02	90%	17%	83%	-		-
10.000 µM ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-		-
Controle positivo										
MMC ⁵ 0,5 µg/mL	442	50	8	1,132	21%	92%	8%	16		P=0,002
MMC ⁵ 1,0 µg/mL	439	56	5	1,132	21%	104%	-4%	24		P=0,059
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL ⁶ 0,02 µg/mL	450	38	12	1,124	26%	70%	30%	4	20	p=0,0002 (MONONUCLEADA) p=0,013 (BINUCLEADA)

¹Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese, indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B. ²Índice de replicação, indica a proporção de ciclos de divisão celular completos. ³Valores de p no teste do Qui-Quadrado. ⁴Análise de micronúcleos não considerada em 1.600 µM, 4.000 µM e 10.000 µM devido à indução de inibição de crescimento celular superior a 50%. ⁵Mitomomicina C. ⁶Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina).

4.6.3 Ensaio Cometa e micronúcleo *in vitro* da substância 6 – contextualização com os dados da literatura.

A substância 6 sintetizada por Quaresma (2015) apresentou melhor atividade contra as formas tripomastigotas de *T.cruzi* do que a substância 5. A CI_{50} = $353,7 \pm 27,0$ μ M para a substância 6 foi no mínimo 5,6 x menor do que a $CI_{50} > 2000$ μ M obtida para a substância 5, porém segundo Quaresma (2015) a melhora da atividade não foi suficiente para tornar a substância 6 promissora como nova droga para o tratamento da doença de Chagas. Quando comparada à substância 5, houve a introdução de um nitrogênio no anel imidazólico gerando o anel 1,2,4-triazólico. Quando comparado ao MGZ, houve a substituição do anel tiodiazólico pelo anel 1,2,4-triazólico e no anel nitroimidazólico houve a mudança do grupo nitro da posição 5 para a posição 4.

A substância 6, testada na faixa de concentrações de 149 μ M a 10.000 μ M durante 2h, induziu quebra de fita do DNA altamente significativa ($p < 0,001$) na concentração de 6.400 μ M e significativa ($p < 0,05$) em 10.000 μ M quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O efeito genotóxico não está associado à citotoxicidade, pois não houve letalidade celular em qualquer concentração utilizada. A substituição do anel tiodiazólico do MGZ pelo anel 1,2,4-triazólico e a mudança do grupo nitro da posição 5 para a posição 4 no núcleo nitroimidazólico não aboliu o efeito de indução de quebras de fita de DNA pelo MGZ. Porém, o efeito mutagênico induzido pela substância 6, foi menos acentuado do que o produzido pelo MGZ que, além das concentrações de 6400 μ M e 10.000 μ M, induziu quebras de fita de DNA em concentração inferior a 6.400 μ M (1562 μ M), cerca de 4X inferior à menor concentração positiva da substância 6.

No ensaio de micronúcleo, a substância 6, na faixa de 150 μ M a 640 μ M não induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro* quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. A substituição do anel tiodiazólico pelo anel 1,2,4-triazólico e a mudança de posição do grupo nitro da posição 5 para a 4 no anel nitroimidazólico aboliu o efeito clastogênico e/ou aneugênico do MGZ. Porém a substância 6 quando comparada ao MGZ mostrou efeito mais acentuado de redução do IR. A substância 6 foi mais citotóxica do que o MGZ causando maior redução do IR das células sanguíneas quando tratadas na concentração de 1.600 μ M (redução de IR 2,4 x

maior), 4.000 μM (cerca de 1,6x) e em 10.000 μM (cerca de 1,6X) quando comparado ao MGZ. Adicionalmente, a substância 6 causou redução de IR de 31% em relação ao solvente na concentração de 640 μM .

4.7 SUBSTÂNCIA 7

4.7.1 Ensaio Cometa

A substância 7 (Figura 1) de PM 266 e fórmula química $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_4$ foi testada em células sanguíneas humanas *in vitro*, no ensaio de citotoxicidade mediado pelo DAF e BrEt e em três ensaios Cometa (ensaio Cometa 1, ensaio Cometa 2 e ensaio Cometa 3) empregando-se nove concentrações da substância na faixa de 149 μM a 6.400 μM em DMSO 5%, que corresponde ao controle solvente.

No ensaio de citotoxicidade, a substância 7 na faixa de concentrações testada de 149 a 6400 μM em DMSO 5% foi citotóxica em células sanguíneas humanas somente nas três primeiras concentrações (149 μM , 238 μM e 382 μM) induzindo leve decréscimo de viabilidade celular de 2 a 4% em relação ao controle-solvente DMSO 5% (Tabela 7). O controle-solvente (DMSO 5%) não induziu morte celular. Desta forma, todas as nove concentrações de 7 foram empregadas no ensaio Cometa em células sanguíneas humanas *in vitro*.

Tabela 7: Ensaio de citotoxicidade da substância 7 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: 2 h a 37^o C

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controles:	
Controle celular	0%
Controle-solvente (DMSO 5%)	0%
Concentrações:substância 7	
149 μM	2%
238 μM	2%
382 μM	4%
610 μM	0%
977 μM	0%
1.562 μM	0%
2.500 μM	0%
4.000 μM	0%
6.400 μM	0%

O Quadro 26 mostra o dano ao DNA expresso em porcentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o primeiro ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. No primeiro ensaio, a substância 7, induziu efeito genotóxico altamente significativo ($p < 0,01$) nas concentrações testadas de 977 μM , 1.562 μM , 4.000 μM e 6.400 μM , quando comparado ao controle solvente (DMSO 5 %). O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 26: Ensaio Cometa 1 da substância 7 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle	89,5	10,5	0,0	0,0	21
Controle solvente (DMSO 5%)	92,0	7,5	0,0	0,5	18
Concentrações Substância 7					
149 μM	81,5	17,5	0,0	1,0	41
238 μM	85,5	14,0	0,0	0,5	31
382 μM	88,0	11,5	0,5	0,0	25
610 μM	83,0	17,0	0,0	0,0	34
977 μM	76,0	22,0	0,5	1,5	55 **
1.562 μM	70,0	29,5	0,5	0,0	61 **
2.500 μM	80,0	19,5	0,0	0,5	42
4.000 μM	77,5	22,0	0,0	0,5	47 **
6.400 μM	71,5	25,0	3,0	0,5	65 **
Controle Positivo					
MMS 160 μM ¹	0,5	1,0	10,5	88,0	572 ***

¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos ** e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA altamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

O Quadro 27 mostra o dano ao DNA expresso em porcentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o segundo ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. No segundo ensaio Cometa, a substância 7 induziu efeito genotóxico altamente significativo ($p < 0,01$) nas concentrações testadas de 610 μM , 4.000 μM e 6.400 μM e significativo ($p < 0,05$) em 977 μM e 2500 μM , quando comparado ao controle solvente (DMSO 5 %). O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 27: Ensaio Cometa 2 da substância 7 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA (%)				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle	92,0	7,5	0,0	0,5	18
Controle solvente (DMSO 5%)	87,0	8,5	1,5	3,0	41
Concentrações Substância 7					
149 µM	85,0	12,0	0,0	3,0	42
238 µM	82,5	16,0	0,5	1,0	40
382 µM	82,5	14,5	0,5	2,5	46
610 µM	63,5	32,0	1,0	3,5	89 **
977 µM	61,5	36,0	0,0	2,5	87 *
1.562 µM	74,0	26,0	0,0	0,0	52
2.500 µM	50,0	46,5	1,5	2,0	111 *
4.000 µM	36,0	59,5	1,5	3,0	143 **
6.400 µM	29,0	60,0	3,0	8,0	180 **
Controle Positivo					
MMS 160 µM ¹	0,0	1,5	11,5	87,0	571 ***

¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos *, ** e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente, aumento de migração de DNA altamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

O Quadro 28 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o terceiro ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. No terceiro ensaio Cometa, a substância 7 induziu efeito genotóxico significativo ($p < 0,05$) somente nas duas maiores concentrações testadas (4.000 µM e 6.400 µM) quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 µM, induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Quadro 28: Ensaio Cometa 3 da substância 7 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA (%)				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle	87,0	13,0	0,0	0,0	26
Controle solvente (DMSO 5%)	86,0	11,0	0,5	2,5	39
Concentrações Substância 7					
149 µM	90,0	8,5	0,5	1,0	25
238 µM	88,5	8,0	1,0	2,5	35
382 µM	87,5	12,0	0,0	0,5	27
610 µM	87,0	12,5	0,0	0,5	28
977 µM	89,0	8,5	0,0	2,5	32
1.562 µM	80,0	18,0	0,0	2,0	48
2.500 µM	74,5	20,0	1,0	4,5	71
4.000 µM	67,5	27,0	2,5	3,0	82 *
6.400 µM	45,5	37,0	5,0	12,5	169 *
Controle Positivo					
MMS 160 µM ¹	0,0	0,5	16,0	83,5	566 ***

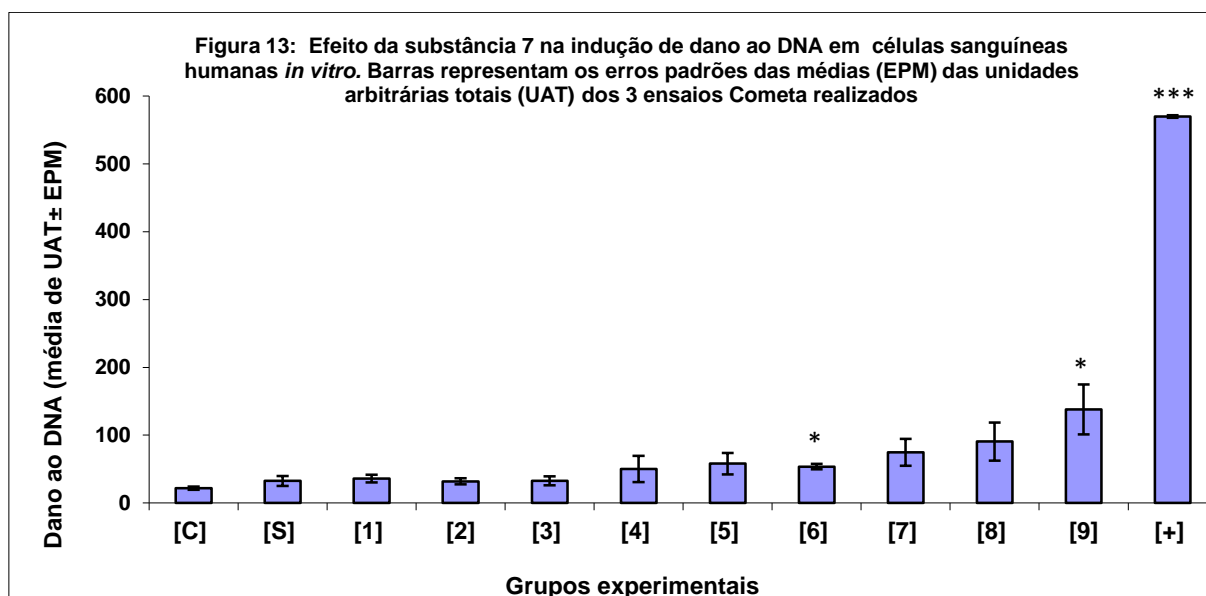
¹ Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Ao se combinar os três ensaios Cometa independentes realizados, verificamos que o tratamento pela substância 7 induziu dano significativo ao DNA ($p < 0,05$) em duas concentrações (1562 µM e 6400 µM) quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. O controle positivo, MMS 160 µM induziu efeito genotóxico extremamente significativo ($p < 0,0001$) em relação ao controle celular. O Quadro 29 e a Figura 13 mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média nos três ensaios para as nove concentrações da substância 7, para os controles negativos (DMSO 5% e controle celular) e controle positivo (MMS 160 µM).

Quadro 29: Ensaio Cometa da substância 7 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades arbitrárias totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 3 ensaios realizados

Grupos	Média (UAT)	Erro padrão da média (UAT)	Teste <i>t</i> (p) ¹
Controles:			
Controle	21,67	2,33	-
Controle Solvente (DMSO 5%)	32,67	7,36	-
Concentrações Substância 7			
149 μ M	36,00	5,51	0,368
238 μ M	32,00	4,36	0,471
382 μ M	32,67	6,69	0,500
610 μ M	50,33	19,41	0,221
977 μ M	58,00	15,95	0,111
1.562 μ M	53,67	3,84	0,032 *
2.500 μ M	74,67	20,00	0,060
4.000 μ M	90,67	28,05	0,058
6.400 μ M	138,00	36,64	0,024 *
Controle positivo:			
MMS 160 μ M ²	569,67	1,86	0,000 ***

¹Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. ²Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.



[C] Controle [S]. Controle-solvente DMSO 5%. Concentrações da substância 7: [1] 149 μ M, [2] 238 μ M, [3] 382 μ M, [4] 610 μ M, [5] 977 μ M, [6] 1.562 μ M, [7] 2.500 μ M, [8] 4.000 μ M, [9] 6.400 μ M. [+] Metanosulfonato de metila 160 μ M. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular

4.7.2 Ensaio de Micronúcleo

A substância 7 em DMSO 5% não foi citotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* (tratamento: 4h) somente na menor concentração testada de 150 μM por não causar redução do IPBC e IR da cultura quando comparado ao controle solvente (Quadro 30).

As demais concentrações da substância 7 foram citotóxicas causando redução do IPBC e IR quando comparados ao controle-solvente. A diminuição dos dois índices foi concentração-dependente na faixa de concentrações de 150 μM a 4000 μM . A redução do IPBC de 36%, 79%, 86% e 62% em relação às culturas controle solvente foi constatada em culturas de células sanguíneas humanas tratadas respectivamente, com as concentrações de 640 μM , 1600 μM , 4.000 μM e 10.000 μM da substância 7. Comparativamente ocorreu redução de IR de 40%, 83% e 89% e 69% para as culturas tratadas com 640 μM , 1600 μM , 4.000 μM e 10.000 μM da substância 7.

A partir dos resultados de citotoxicidade definiu-se 640 μM como a concentração máxima da substância 7 a ser analisada quanto ao número de células micronucleadas por 2000 células binucleadas, pois nesta concentração houve uma redução de 36% do IPBC e 40 % do IR em relação ao controle-solvente, abaixo do valor limite de 50% (OECD, 2014).

A substância 7 não induziu aumento significativo de formação de micronúcleos em células sanguíneas humanas *in vitro* nas concentrações analisadas (150 μM e 640 μM) quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. O controle positivo MMC 1,0 $\mu\text{g/ml}$ induziu aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de células micronucleadas em células binucleadas em relação ao controle celular. COL 0,02 $\mu\text{g/mL}$ não induziu aumento de células micronucleadas em células mononucleadas e em células binucleadas em relação ao controle celular (Quadro 30).

Conclui-se que a substância 7 não foi capaz de induzir quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro*.

Quadro 30: Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese da substância 7 em células sanguíneas humanas.

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS/500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		ENSAIO DE MICRONÚCLEO		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC ¹	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR ²	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)	TESTE QUI QUADRADO (p) ³	
Controles										
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
Controle Celular	406	63	31	1,250	-	-	-	24	20	-
								NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
Controle Solvente (DMSO 5%)	421	78	1	1,160	-	-	-	36		-
Concentrações Substância 7										
150 µM	412	82	6	1,188	- 17%	105%	-5%	24		P=0,152
640 µM	451	47	2	1,102	36%	60%	40%	20		P=0,043
1.600 µM ⁴	485	13	2	1,034	79%	17%	83%	-		-
4.000 µM ⁴	490	9	1	1,022	86%	11%	89%	-		-
10.000 µM ⁴	473	24	3	1,060	62%	31%	69%	-		-
Controle positivo										
MMC ⁵ 0,5 µg/mL	445	46	9	1,128	49%	73%	27%	28		P=0,309
MMC ⁵ 1,0 µg/mL	442	48	10	1,136	46%	76%	24%	40		P=0,013 *
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL ⁶ 0,02 µg/mL	433	46	21	1,176	30%	73%	27%	12	20	p=0,065 (MONONUCLEADA) p=0,874 (BINUCLEADA)

¹Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese (indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B). ²Índice de replicação, indica a proporção de ciclos de divisão celular completos. ³Valores de p no teste do Qui-Quadrado. ⁴Análise de micronúcleos não considerada em 1.600 µM, 4.000 µM e 10.000 µM devido à indução de inibição de crescimento celular superior a 50%. ⁵Mitomicina C. ⁶Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina). Pelo teste de Qui-Quadrado, *significa aumento de células micronucleadas estatisticamente significativo (p<0,05) em relação ao controle celular.

4.7.3 Ensaios Cometa e micronúcleo *in vitro* da substância 7 – contextualização com os dados da literatura.

A substância 7 sintetizada por Quaresma (2015); BOECHAT e colaboradores (2016) apresentou melhor atividade contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* do que as substâncias 5 e 6. A $CI_{50} = 45,3 \pm 4,0 \mu M$ para a substância 7 foi, no mínimo, 44 X menor do que a $CI_{50} > 2000 \mu M$ obtida para a substância 5 e cerca de 7,8 X menor do que a $CI_{50} = 353,7 \pm 27,0 \mu M$ obtida para a substância 6 (QUARESMA, 2015). Quando comparado ao MGZ, houve a substituição do anel tiodiazólico pelo anel 1,2,3-triazólico com carboxilato de etila ligado ao C-4 do triazol e no anel imidazólico houve a mudança do grupo nitro da posição 5 para a posição 4. Estudo de cristalografia da substância 7 foi realizada por Boechat e colaboradores (2016) para confirmação da estrutura química.

A substância 7, testada na faixa de concentrações de 149 μM a 6.400 μM durante 2h, induziu quebra de fita do DNA ($p < 0,05$) em duas concentrações (1562 μM e 6400 μM) em células sanguíneas humanas *in vitro*, quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. O efeito genotóxico não está associado à citotoxicidade, pois não houve letalidade celular nestas duas concentrações. A substituição do anel tiodiazólico pelo anel 1,2,3-triazólico com carboxilato de etila ligado ao C-4 do triazol e a mudança do grupo nitro da posição 5 para a posição 4 no anel imidazólico não influenciou o efeito de indução de quebras de fita de DNA pelo MGZ.

No ensaio de micronúcleo, a substância 7, na faixa de 150 μM a 640 μM não induziu quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro* quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. A substituição do anel tiodiazólico pelo anel 1,2,3-triazólico com carboxilato de etila ligado ao C-4 do triazol e a mudança do grupo nitro da posição 5 para a posição 4 no anel imidazólico aboliu o efeito clastogênico e/ou aneugênico do MGZ. Porém a substância 7, quando comparada ao MGZ mostrou efeito mais acentuado de redução do IR. A substância 7 foi mais citotóxica do que o MGZ causando maior redução do IR das células sanguíneas quando tratadas na concentração de 1.600 μM (redução de IR 2,7 x maior), 4.000 μM (cerca de 1,7x) e em 10.000 μM (cerca de 1,1X) quando comparado ao MGZ. Adicionalmente, a

substância 7 causou redução de IR de 40% em relação ao solvente-solvente na concentração de 640 μM .

4.8 SUBSTANCIA 8

4.8.1 Ensaio Cometa

A substância 8 (Figura 1) de PM 234 e fórmula química $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2$ foi testada em células sanguíneas humanas *in vitro*, no ensaio de citotoxicidade mediado pelo DAF e BrEt e em dois ensaios Cometa (ensaio Cometa 1 e ensaio Cometa 2) empregando-se dez concentrações da substância na faixa de 149 μM a 10.000 μM em DMSO 5%, que corresponde ao controle solvente.

A substância 8 induziu pequeno decréscimo de viabilidade celular (1 a 4%) em cinco concentrações (149 μM , 238 μM , 382 μM , 2.500 μM e 10000 μM), quando comparada ao controle-solvente (DMSO 5%). Nas demais concentrações, a substância 8 não induziu morte celular. Desta forma, todas as dez concentrações de 8 foram empregadas no ensaio Cometa em células sanguíneas humanas por apresentarem valores de citotoxicidade inferiores a 30% (Tabela 8).

Tabela 8: Ensaio de citotoxicidade da substância 8 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: 2 h a 37⁰ C

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controles:	
Controle celular	0%
Controle-solvente (DMSO 5%)	0%
Concentrações:substância 8	
149 μM	4%
238 μM	1%
382 μM	2%
610 μM	0%
977 μM	0%
1.562 μM	0%
2.500 μM	1%
4.000 μM	0%
6.400 μM	0%
10.000 μM	2%

O Quadro 31 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o primeiro ensaio

Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. No primeiro ensaio Cometa, a substância 8 induziu efeito genotóxico significativo ($p < 0,05$) na concentração de 610 μM e dano ao DNA altamente significativo ($p < 0,01$) nas duas maiores concentrações testadas (6.400 e 10.000 μM) quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle.

Quadro 31: Ensaio Cometa 1 da substância 8 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA (%)				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle	90,0	9,5	0,0	0,5	22
Controle solvente (DMSO 5%)	89,0	7,0	0,5	3,5	37
Concentrações Substância 8					
149 μM	84,0	13,5	0,0	2,5	42
238 μM	84,5	13,0	0,5	2,0	40
382 μM	81,0	17,5	0,0	1,5	44
610 μM	77,5	17,5	0,5	4,5	64 *
977 μM	87,0	9,0	0,0	4,0	42
1.562 μM	81,0	14,0	0,0	5,0	58
2.500 μM	79,0	16,5	0,0	4,5	60
4.000 μM	84,5	8,0	1,0	6,5	59
6.400 μM	73,5	13,5	1,0	12,0	103 **
10.000 μM	75,5	11,0	2,0	11,5	99 **
Controle Positivo					
MMS 160 μM ¹	0,0	4,5	19,0	76,5	544 ***

¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos *, ** e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente, aumento de migração de DNA altamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

O Quadro 32 mostra o dano ao DNA expresso em percentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de UAT obtidos para o segundo ensaio Cometa realizado em células sanguíneas humanas *in vitro*. No segundo ensaio Cometa, a substância 8 induziu efeito genotóxico significativo ($p < 0,05$) nas concentrações de 2.500 e 4000 μM e dano ao DNA altamente significativo ($p < 0,01$) na maior concentração testada (10.000 μM), quando comparado ao controle solvente (DMSO 5%). O controle positivo, MMS 160 μM , induziu efeito genotóxico

bem evidente e extremamente significativo ($p < 0,0001$) em relação ao controle celular.

Quadro 32: Ensaio Cometa 2 da substância 8 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA (%) e dano ao DNA em Unidades arbitrárias Totais (U.A.T.)

Grupos	Classes de Dano ao DNA				U.A.T.
	0	1	2	3	
Controles					
Controle	91,5	8,5	0,0	0,0	17
Controle solvente	91,5	7,5	0,0	1,0	21
Concentrações Substância 8					
149 μM	85,5	12,0	0,0	2,5	39
238 μM	89,0	9,5	0,5	1,0	27
382 μM	85,0	12,5	0,5	2,0	39
610 μM	81,0	18,0	0,0	1,0	42
977 μM	90,0	8,5	1,0	0,5	24
1.562 μM	81,5	16,0	0,0	2,5	47
2.500 μM	82,0	13,5	0,0	4,5	54 *
4.000 μM	76,5	18,0	1,0	4,5	67 *
6.400 μM	81,0	13,0	1,5	4,5	59
10.000 μM	65,5	23,5	2,0	9,0	109 **
Controle Positivo					
MMS 160 μM ¹	0,0	0,0	9,5	90,5	581 ***

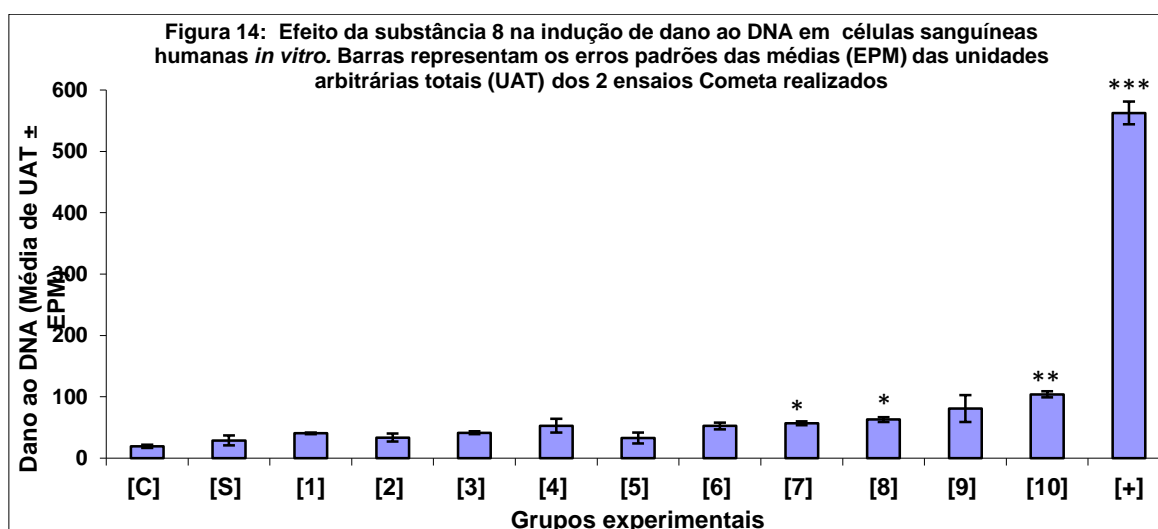
¹Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos *, ** e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente, aumento de migração de DNA altamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.

Ao se combinar os dois ensaios Cometa independentes realizados, verificamos que o tratamento pela substância 8 induziu dano significativo ao DNA ($p < 0,05$) em duas concentrações (2.500 μM e 4.000 μM) e altamente significativo ($p < 0,01$) na mais alta concentração testada (10.000 μM) quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. O controle positivo, MMS 160 μM induziu efeito genotóxico extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle. O Quadro 33 e a Figura 14 mostram o dano ao DNA, expresso como valor médio de UAT e erro padrão da média nos dois ensaios para as dez concentrações da substância 8, para os controles negativos (DMSO 5% e controle celular) e controle positivo (MMS 160 μM).

Quadro 33: Ensaio Cometa da substância 8 em células sanguíneas humanas *in vitro*. Dano ao DNA em valores médios \pm erro padrão da média de Unidades arbitrárias totais (U.A.T.). Combinação dos resultados dos 2 ensaios realizados

Grupos	Média (UAT)	Erro padrão da média (UAT)	Teste t (p) ¹
Controles:			
Controle celular	19,50	2,50	-
Controle Solvente (DMSO 5%)	29,00	8,00	-
Concentrações: Substância 8			
149 μ M	40,50	1,50	0,147
238 μ M	33,50	6,50	0,352
382 μ M	41,50	2,50	0,137
610 μ M	53,00	11,00	0,110
977 μ M	33,00	9,00	0,386
1.562 μ M	52,50	5,50	0,068
2.500 μ M	57,00	3,00	0,041 *
4.000 μ M	63,00	4,00	0,031 *
6.400 μ M	81,00	22,00	0,078
10.000 μ M	104,00	5,00	0,008 **
Controle positivo:			
MMS 160 μ M ²	562,50	18,50	0,001 ***

¹Valores de p no teste t de *Student* monocaudal. ²Metanosulfonato de metila. Pelo teste t de *Student* os asteriscos *, ** e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente, aumento de migração de DNA altamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular.



[C] Controle [S] Controle-solvente DMSO 5%. Concentrações da substância 8: [1] 149 μ M, [2] 238 μ M, [3] 382 μ M, [4] 610 μ M, [5] 977 μ M, [6] 1.562 μ M, [7] 2.500 μ M, [8] 4.000 μ M, [9] 6.400 μ M, [10] 10.000 μ M. [+] Metanosulfonato de metila 160 μ M. Pelo teste t de *Student* os asteriscos * e *** indicam respectivamente, aumento de migração de DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle-solvente e aumento de migração de DNA extremamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao controle celular

4.8.2 Ensaio de Micronúcleo

A substância 8 em DMSO 5% foi citotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* (tratamento: 4h) nas cinco concentrações testadas (150 μ M a 10.000 μ M) causando redução do IPBC e IR quando comparados ao controle-solvente (Quadro 34). A diminuição dos dois índices foi concentração-dependente. A redução do IPBC de 27%, 38%, 49% e 82% e 97,5% em relação às culturas controle solvente foi constatada em culturas de células sanguíneas humanas tratadas respectivamente, com as concentrações de 150 μ M, 640 μ M, 1600 μ M, 4.000 μ M e 10.000 μ M da substância 8. Comparativamente ocorreu redução de IR de 21%, 42% e 39%, 77% e 97% para as culturas tratadas com as mesmas concentrações mencionadas imediatamente acima.

A partir dos resultados de citotoxicidade definiu-se 1.600 μ M como a concentração máxima da substância 8 a ser analisada quanto ao número de células micronucleadas por 2000 células binucleadas, pois nesta concentração houve uma redução de 49% do IPBC e 39 % do IR em relação ao controle-solvente, abaixo do valor limite de 50% (OECD, 2014).

A substância 8 não induziu a formação de micronúcleos em células sanguíneas humanas *in vitro* ($p > 0,1$). MMC 1,0 μ g/ml não induziu aumento significativo ($p > 0,1$) de células micronucleadas em células binucleadas em relação ao controle celular. O controle positivo COL 0,02 μ g/mL, não foi visualizada a formação de células micronucleadas em células mononucleadas e binucleadas do sangue (Quadro 34). Conclui-se que a substância 8 não foi capaz de induzir quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro*.

Quadro 34: Citotoxicidade e ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese da substância 8 em células sanguíneas humanas.

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS QUANTO AO NÚMERO DE NÚCLEOS/500 CÉLULAS			MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		MEDIDA DE CITOTOXICIDADE		ENSAIO DE MICRONÚCLEO		
	MONO	BI	MULTINUCLEADAS	IPBC ¹	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	IR ²	ATIVIDADE CITOSTÁTICA (%)	NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (NCMN)		TESTE QUI-QUADRADO (p) ³
Controles										
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
Controle Celular	400	96	4	1,208	-	-	-	16	32	-
								NÚMERO DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS		
Controle Solvente (DMSO 5%)	392	97	11	1,238	-	-	-	25		-
Concentrações Substância 8										
150 µM	418	77	5	1,174	27%	79%	21%	24		P=1,000
640 µM	435	56	9	1,148	38%	58%	42%	27		P=0,889
1.600 µM	440	59	1	1,122	49%	61%	39%	40		P=0,080
4.000 µM ⁴	478	22	0	1,104	82%	23%	77%	-		-
10.000 µM ⁴	497	3	0	1,006	97%	3%	97%	-		-
Controle positivo										
MMC ⁵ 0,5 µg/mL	453	41	6	1,106	49%	43%	57%	-		-
MMC ⁵ 1,0 µg/mL	448	48	4	1,112	46%	50%	50%	40		P=0,405
								NCMN/2000 CÉLULAS MONONUCLEADAS	NCMN/2000 CÉLULAS BINUCLEADAS	
COL ⁶ 0,02 µg/mL	450	47	3	1,106	49%	49%	51%	-	-	-

¹Índice de proliferação a partir do bloqueio da citocinese, indica o número médio de núcleos por célula na presença de citocalasina B. ²Índice de replicação, indica a proporção de ciclos de divisão celular completos. ³Valores de p no teste do Qui-Quadrado. ⁴Análise de micronúcleos não considerada em 4.000 µM e 10.000 µM devido à indução de inibição de crescimento celular superior a 50%. ⁵Mitomomicina C. ⁶Colcemid (N-desacetil-N-metilcolchicina).

4.8.3 Ensaio Cometa e micronúcleo *in vitro* da substância 8 – contextualização com os dados da literatura.

A substância 8 sintetizada por Quaresma (2015); Boechat e colaboradores (2016) apresentou melhor atividade contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* do que as substâncias 1, 5, 6 e 7, bem como ao benznidazol. A $CI_{50}=5,4\pm 0,63 \mu\text{M}$ para a substância 8 foi no mínimo, 370 X menor do que a $CI_{50} > 2000 \mu\text{M}$ obtida para a substância 5, cerca de 8,4 X menor do que a obtida para a substância 7 ($CI_{50}=45,3\pm 4,0 \mu\text{M}$), cerca de 7,8 X menor do que a $CI_{50}=353,7\pm 27,0 \mu\text{M}$ obtida para a substância 6, 2X menor do que a $CI_{50}=10,8\pm 0,5 \mu\text{M}$ do benznidazol (QUARESMA, 2015) e quase 2X menor do que a $CI_{50}=9,9\pm 0,8 \mu\text{M}$ obtida para o MGZ (CARVALHO et al., 2007).

Em relação ao MGZ, houve a substituição do anel tiodiazólico pelo anel 1,2,3-triazólico com ciclopropila ligado ao C-4 do triazol e no anel imidazólico houve a mudança do grupo nitro da posição 5 para a posição 4. Estudo de cristalografia da substância 8 foi realizada por Boechat e colaboradores (2016) para confirmação da estrutura química. A introdução do ciclopropila no C-4 do triazol para se avaliar a influência do volume espacial, rigidez e lipofilicidade na molécula frente à atividade biológica em relação ao *T. cruzi*, resultou no aumento da atividade tripanomicida *in vitro* da substância 8 em relação ao MGZ e ao benznidazol empregada clinicamente no tratamento da doença de Chagas (QUARESMA, 2015; Boechat et al, 2016).

A substância 8, testada na faixa de concentrações de 149 μM a 10.000 μM durante 2h, induziu significativa ($p < 0,05$) quebra de fita do DNA em duas concentrações (2.500 μM e 4.000 μM) e altamente significativa quebra ($p < 0,01$) na mais alta concentração testada (10.000 μM) em células sanguíneas humanas *in vitro*, quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. O efeito indutor de quebra de fita de DNA não foi associado à citotoxicidade, pois nas duas concentrações positivas houve baixa letalidade celular de 1% (2.500 μM), de 2% para a 10.000 μM , quando comparado ao controle-solvente. Na concentração de 4.000 μM não ocorreu morte celular.

No ensaio de micronúcleo, a substância 8, na faixa de 150 μM a 1600 μM não induziu ($p > 0,1$) quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas após 4h de tratamento *in vitro* quando comparado ao controle-solvente DMSO 5%. A substituição do anel tiodiazólico pelo anel 1,2,3-

triazólico com ciclopropila ligado ao C-4 do triazol e a mudança do grupo nitro no anel imidazólico da posição 5 para a posição 4, aboliu o efeito clastogênico e/ou aneugênico do MGZ. Porém a substância 8, quando comparada ao MGZ mostrou efeito mais acentuado de redução do IR. A substância 8 causou maior redução do IR do que o MGZ nas células sanguíneas tratadas na concentração de 4.000 μM (1,5 X maior) e em 10.000 μM (1,6 X) quando comparado ao MGZ. Adicionalmente, a substância 8 causou redução de IR de 21% (150 μM), 42% (640 μM) e de 39% para 1.600 μM em relação ao solvente-solvente.

4.9 IMPORTÂNCIA DOS ENSAIOS COMETA E MICRONÚCLEO EM ESTUDOS DE GENOTOXICIDADE DE NOVAS DROGAS CANDIDATAS

Os agentes físicos, substâncias químicas e biológicas ao interagir com o DNA podem causar mutações (MULLER, 1928; BEALE, 1993; MAILING, 2004) que estão associadas à instabilidade genômica e câncer (MIYAMAE et al, 1998). Conseqüentemente, testes de genotoxicidade são exigidos pelas agências regulatórias para se avaliar o risco potencial de indução de câncer.

Dentre estes testes o ensaio Cometa, principalmente *in vivo* e o MN *in vitro* são os mais empregados na avaliação do potencial risco de indução de câncer (ARALDI et al, 2015).

No estudo realizado foi evidenciado para o MGZ efeito indutor de quebra de fita de DNA através do ensaio Cometa e efeito clastogênico e/ou aneugênico pelo teste de micronúcleo (Quadros 35 e 36).

No ensaio Cometa, duas substâncias (2 e 5) não induziram dano ao DNA, enquanto as demais foram positivas. Sob condições alcalinas, o ensaio Cometa pode detectar quebras de fita única e dupla do DNA resultantes, por exemplo, das interações diretas com o DNA, dos sítios álcali-sensíveis ou como uma consequência de quebras de fita de DNA transitórias resultantes de reparo do DNA por excisão. Estas quebras de fita podem ser reparadas, resultando em efeito não persistente, podem ser letais à célula, ou podem ser fixadas numa mutação resultando em mudança permanente viável. Estas quebras de fita podem também causar danos cromossômicos (OECD, 2014b).

Na estratégia de avaliação de drogas maior relevância deverá ser dada aos resultados obtidos no ensaio de micronúcleo *in vitro* do que no ensaio Cometa *in vitro* porque o ensaio de micronúcleo *in vitro* é considerado o teste padrão nas diretrizes para avaliação de medicamentos diferentemente do ensaio Cometa *in vitro* (ICH, 2012; TWEATS; TRUNZ; TORREELE, 2012).

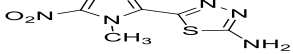
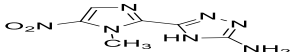
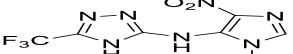
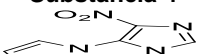


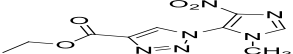
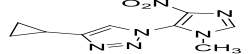
Algumas vantagens do ensaio de micronúcleo em relação ao ensaio Cometa incluem: o ensaio de micronúcleo considera somente danos genéticos em células mitóticas, enquanto o ensaio Cometa detecta danos no DNA em ambas as células mitóticas e interfásicas (MILLER; POTTER-IOCHER, 1998); o ensaio de micronúcleo tem um maior poder estatístico, desde que no ensaio de micronúcleo são analisados 2000 células, enquanto no ensaio Cometa são analisadas 100 células (MILLER; POTTER-IOCHER, 1998).

Das sete substâncias estudadas análogas ao MGZ, cinco se mostraram negativas no ensaio de micronúcleo *in vitro* em células sanguíneas humanas (Quadro 36). Dentre as substâncias negativas, a substância 8 foi a mais promissora para prosseguir no desenvolvimento como droga-candidata no tratamento da doença de Chagas. Além da ausência de efeito mutagênico indutor de quebras cromossômicas e/ou ganho ou perda de cromossomos em células sanguíneas humanas, a substância 8 mostrou alta atividade tripanomicida, cerca de duas vezes superior ao MGZ e duas vezes superior à droga benznidazol usada clinicamente.

4.10 RESUMO DOS RESULTADOS DO ENSAIO COMETA E DO ENSAIO DE MICRONÚCLEO

O Quadro 35, abaixo resume os resultados obtidos a partir dos ensaios de citotoxicidade realizados nos ensaios Cometa e micronúcleo para as oito substâncias estudadas.

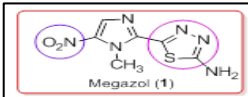
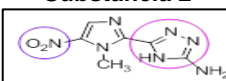
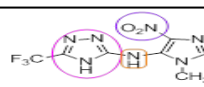
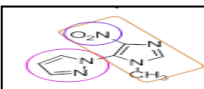
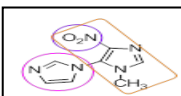
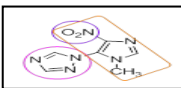
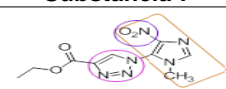
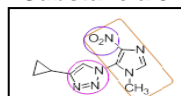
Quadro 35: Resumo dos resultados do ensaio *in vitro* de citotoxicidade mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio no ensaio Cometa e da citotoxicidade medida pelo Índice de Proliferação pelo Bloqueio de Citocinese (IPBC) e Índice de Replicação (IR) no ensaio de micronúcleo *in vitro* pelo bloqueio da citocinese do megazol (substância 1) e de seus análogos (2-8) em células sanguíneas humanas.

SUBSTÂNCIA	CITOTOXICIDADE (ENSAIO COMETA)	CITOTOXICIDADE (ENSAIO DE MICRONÚCLEO)
Substância 1 	Decréscimo de viabilidade: 238 µM (4%) sem aumento nas concentrações subsequentes. Faixa testada (149 µM a 10.000 µM)	Decréscimo de IPBC: 1600 µM (31%), 4.000µM (50%), 10.000µM (63%). Decréscimo de IR: 1.600 µM (31%), 4.000 µM (51%), 10.000 µM (62%)
Substância 2 	Decréscimo de viabilidade: 149 µM, 238 µM, 382 µM, 1.562 µM e 2.500 µM (1%). Faixa testada (149 µM a 6.400 µM)	Decréscimo de IPBC: 4.000 µM (73%), 10.000 µM (74%). Decréscimo de IR: 1600 µM (24%) 4.000 µM (78%), 10.000 µM (77%).
Substância 3 	Decréscimo de viabilidade: 4.000 µM (2%), 6.400 µM (1%) e 10.000 µM (2%) Faixa testada (149 µM a 10.000 µM)	Decréscimo de IPBC: 640 µM (4%), 1600 µM (19%), 10.000 µM (36%). Decréscimo de IR: 1600 µM (5%), 10.000 µM (22%).
Substância 4 	Decréscimo de viabilidade: 238 µM (2%) e 2.500 µM (4%) Faixa testada (149 µM a 6.400 µM)	Decréscimo de IPBC: 4.000 µM (47%), 10.000 µM (72%). Decréscimo de IR: 4.000 µM (44%), 10.000 µM (76%)
Substância 5 	Decréscimo de viabilidade: 149 µM (2%), 382 µM (3%), 610 µM e 977 µM (2%) e 2.500 µM (1%) Faixa testada (149 µM a 6.400 µM)	Decréscimo de IPBC: 1.600 µM (80%), 4.000 µM (41%), 10.000 µM (59%) Decréscimo de IR: 1.600 µM (77%), 4000 µM (32%), 10.000 µM (57%)
Substância 6 	Ausência de citotoxicidade Faixa testada (149 µM a 10.000 µM)	Decréscimo de IPBC: 150 µM (23%), 640 µM (46%), 1.600 µM (86%), 4.000 µM (90%), 10.000 µM (100%) Decréscimo de IR: 640 µM (31%), 1.600 µM (74%), 4.000 µM (83%), 10.000 µM (100%)
Substância 7 	Decréscimo de viabilidade: 149 µM (2%), 238 µM (2%) e 382 µM (4%) Faixa testada (149 µM a 6.400 µM)	Decréscimo de IPBC: 640 µM (36%), 1.600 µM (79%), 4.000 µM (86%), 10.000 µM (62%) Decréscimo de IR: 640 µM (40%) 1.600 µM (83%), 4.000 µM (89%), 10.000 µM (69%)
Substância 8 	Decréscimo de viabilidade: 149 µM (4%), 238 µM (1%), 382 µM (2%), 2.500 µM (1%) e 10.000 µM (2%). Faixa testada (149 µM a 10.000 µM)	Decréscimo de IPBC: 150 µM (27%), 640 µM (38%), 1600 µM (49%), 4.000 µM (82%), 10.000 µM (97,5%) Decréscimo de IR: 150 µM (21%), 640 µM (42%), 1600 µM (39%), 4.000 µM (77%), 10.000 µM (97%)

4.11 RESUMO DOS RESULTADOS DO ENSAIO COMETA E ENSAIO DE MICRONUCLEO QUANTO A GENOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E DOSE LETAL

O Quadro 36, abaixo resume os resultados obtidos quanto a genotoxicidade, mutagenicidade e de dose letal para as oito substâncias estudadas.

Quadro 36: Resumo dos resultados da genotoxicidade, mutagenicidade do megazol (substância 1) e de seus análogos (2-8) em células sanguíneas humanas *in vitro* e suas atividades tripanomicidas *in vitro*.

SUBSTÂNCIA	GENOTOXICIDADE	MUTAGENICIDADE	ATIVIDADE TRIPANOMICIDA
Substância 1  Megazol (1)	- Dano ao DNA: 1.562 μ M, 6.400 μ M e 10.000 μ M ($p < 0,05$)	- Aumento de formação de micronúcleos: 1.600 μ M e 4.000 μ M ($p < 0,01$) Faixa analisada (150 μ M-4000 μ M)	- DL ₅₀ (<i>T. cruzi</i>) = 9,9 \pm 0,8 μ M e (<i>T. brucei</i>) = 0,14 \pm 0,01 μ M
Substância 2 	Ausência de genotoxicidade (149 μ M a 6.400 μ M)	- Aumento de formação de micronúcleos: 1.600 μ M ($p < 0,05$) Faixa analisada (150 μ M a 1.600 μ M)	- DL ₅₀ (<i>T. cruzi</i>) = 256,8 \pm 53,0 μ M e (<i>T. brucei</i>) > 40 μ M
Substância 3 	- Dano ao DNA: 977 μ M, 4.000 μ M, 6.400 μ M, 10.000 μ M ($p < 0,05$)	Ausência de mutagenicidade Faixa analisada (150 μ M a 10.000 μ M)	- Dose letal para 100% dos parasitas de <i>T. cruzi</i> = 0,3 mg/mL
Substância 4 	- Dano ao DNA: somente na maior concentração 6.400 μ M ($p < 0,05$)	Ausência de mutagenicidade Faixa analisada (150 μ M a 4.000 μ M)	- DL ₅₀ (<i>T. cruzi</i>) = 120 μ M - Dose letal para 100% dos parasitas de <i>T. cruzi</i> = 2,5 mg/mL
Substância 5 	Ausência de genotoxicidade (149 μ M a 6.400 μ M)	- Aumento de formação de micronúcleos: 4000 μ M ($p < 0,05$) Faixa analisada (150 μ M a 4.000 μ M)	- DL ₅₀ (<i>T. cruzi</i>) = > 2000 μ M
Substância 6 	- Dano ao DNA: 6.400 μ M ($p < 0,001$) e 10.000 μ M ($p < 0,05$)	Ausência de mutagenicidade Faixa analisada (150 μ M e 640 μ M)	- DL ₅₀ (<i>T. cruzi</i>) = 353,7 \pm 27,0 μ M
Substância 7 	- Dano ao DNA: 1.562 μ M e 6400 μ M ($p < 0,05$)	Ausência de mutagenicidade Faixa analisada (150 μ M e 640 μ M)	- DL ₅₀ (<i>T. cruzi</i>) = 45,3 \pm 4,0 μ M
Substância 8 	- Dano ao DNA: 2.500 μ M e 4.000 μ M ($p < 0,05$) e 10.000 μ M ($p < 0,01$)	Ausência de mutagenicidade Faixa analisada (150 μ M e 1600 μ M)	- DL ₅₀ (<i>T. cruzi</i>) = 5,4 \pm 0,63 μ M

5 CONCLUSÕES

A substituição do anel tiodiazólico do MGZ pelo anel 1,2,3-triazólico com ciclopropila ligado ao C-4 do triazol e a mudança do grupo nitro da posição 5 para a posição 4 do anel imidazólico aboliu o indesejado efeito mutagênico do MGZ (BOUTEILLE et al., 1995) e o resultante e preocupante efeito em relação à carcinogenicidade do MGZ (NESSLANY et al, 2004).

A substância 8 foi considerada a mais promissora para o prosseguimento dos estudos de desenvolvimento como droga-candidata com potencial emprego no tratamento da doença de Chagas. Além da ausência de efeito clastogênico e/ou aneugênico em células sanguíneas humanas *in vitro*, a substância 8 apresentou alta atividade tripanomicida, duas vezes superior ao BZN e ao MGZ.

6 PERSPECTIVAS

Os mecanismos envolvidos nas atividades genotóxica/mutagênica e terapêutica dos compostos nitroimidazólicos ainda necessitam ser esclarecidos (WALSH et al., 1987; SPERANDEO et al., 2004). As alterações estruturais que diferencialmente afetam as atividades mutagênicas e tripanomicidas dos compostos nitroimidazólicos são de grande interesse para a produção de novas drogas com potente atividade farmacológica e ausência de mutagenicidade.

Através deste projeto em parceria com Farmanguinhos, unidade produtora de medicamentos da FIOCRUZ, espera-se:

- Contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos nitroimidazólicos a serem empregados no tratamento da doença de Chagas e do sono, cujo arsenal terapêutico está restrito a drogas de alta toxicidade indesejável, inclusive mutagênicas, o que não é recomendado, pois o tratamento a longo prazo pode conduzir a neoplasias;
- Avaliar a genotoxicidade *in vivo* da substância 8 no estudo combinado de micronúcleo em células de medula óssea de camundongos e no ensaio Cometa *in vivo* no fígado de camundongos, como recomendado pelas publicações ICH S2A e ICH S2B;
- Obter a partir deste estudo, segurança suficiente de que a substância não possui um perigo genotóxico em pacientes.

REFERÊNCIAS

- AL-SOUD, Y. A.; AL-MASOUDI, N. A.; HASSAN, H. G. et al. Nitroimidazoles. V. Synthesis and anti-HIV evaluation of new 5-substituted piperazinyl-4-nitroimidazole derivatives. **Acta Pharm.** v. 57, p. 379-393, 2007.
- ARALDI, R. P.; RECHIUTTI, B. M.; MENDES, T. B. et al. Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. **Genet. Mol. Res.** v. 13. p. 5207–5220, 2014.
- ARALDI, R. P.; MELO, T. C.; MENDES, T. B; et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy** . v. 72, p. 74–82, 2015.
- ARANTES, Fabricio Soares. **Comparação das duas principais rotas de obtenção do megalzol**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BARRETT, M. P.; FAIRLAMB, A. H.; ROUSSEAU, B. et al. Uptake of the nitroimidazole drug megalzol by African trypanosomes. **Biochem. Pharmacol.** v.59, n.6, p.615-620, 2000.
- BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; LAZZARI, J. O. et al. The trypanosomiasis. **Lancet**, v. 362, p. 1469-1480, 2003.
- BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo : Atheneu Editora, 2008. p. 61-70.
- BEALE, G. The discovery of mustard gas mutagenesis by Auerbach and Robson in 1941. **Genetics**, v.134, p.393-399, 1993.
- BERGSTEN-TORRALBA, L. R.; ZAMITH, H. P.S.; CONDE, T. R. et al. Dye detoxification by *Lentinula edodes* INCQS 40220. **Vigil. Sanit. Debate**, v. 4(1), p. 92-99, 2016.
- BODA, C.; ENANGA, B.; DUMET, H. et, al. Plasma kinetics and efficacy of oral megalzol treatment in *Trypanosoma brucei brucei*-infected sheep. **Veterinary Parasitology**. v.121, p. 213-223, 2004.

BOECHAT, N., CARVALHO, A. S., FERNANDEZ-FERREIRA, E., et al. Novel nitroimidazoles with trypanocidal and cell growth inhibition activities. **Cytobios.** v. 105. p. 83-90, 2001.

BOECHAT, N.; BOZZA, M.; PINTO, A. C. 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,p.625-632, 2006.

BOECHAT N.; CARVALHO, A. S.; SALOMÃO, K. et al. Studies of genotoxicity and mutagenicity of nitroimidazoles: demystifying this critical relationship with the nitro group. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 110, n. 4, p. 492-499, 2015.

BOECHAT, N.; CARVALHO, A. S; QUARESMA, B. M .C .S et al. 4-Cyclopropyl-1-(1-methyl-4-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazole and Ethyl 1-(1-methyl-4-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate. **J. Chem. Cristallogr.**, v.46, p.6-12, 2016.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis.** v. 28. n. 3. p.625–631, 2007.

BOUTEILLE, B.; MARIE-DARAGON, A.; CHAUVIÈRE, G. et, al. Effect of megalozol on *Trypanosoma brucei brucei* acute and subacute infections in Swiss mice. **Acta Tropica**, v. 60, p.73-80, 1995.

BRAMBILLA, G., MARTELLI, A.; Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research.** v. 60. p. 1-17, 2009.

BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Consenso Brasileiro em Doença de Chagas.** Rev Soc Bras Med Trop, v.38, supl III, 2005. 29 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2007. p. 180.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário Terapêutico Nacional 2010: Rename 2010**, Brasília, 2. ed, 2010. p. 1135.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. GESEF. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 agosto 2016.

BRASIL, CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Normativas do Concea que reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica**. Brasília, 2014. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf. Acesso em: 02 de dezembro de 2016.

BUSATTI, H. G. N. O. **Investigação “in vitro” do potencial giardicida de quatro análogos do metronidazol**. 2006. 63 f. Tese (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

BUSCHINI, A.; GIORDANI, F; NORTHFLEET DE ALBUQUERQUE C., et al. Trypanocidal nitroimidazole derivatives: Relationships among chemical structure and genotoxic activity. **Biochem. Pharmacol.**, v.73: p.1537-1547, 2007.

CARVALHO, A. S.; **Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Compostos Azólicos como Candidatos a Agentes Tripanomicidas**. 2000. 185f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

CARVALHO M. B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. J. F. et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 48. p. 317-322, 2002.

CARVALHO, A. S; MENNA-BARRETO, R. F. S.; ROMEIRO, N. C. et al. Design, synthesis and activity against *Trypanosoma cruzi* of azaheterocyclic analogues of megalin. **Medicinal Chemistry Research**. v.3, n.5, p.460-465, 2007.

CARVALHO, A. S., LOPES, F. A. S., SALOMÃO, K. et al. Studies toward the structural optimization of new brazilzone-related trypanocidal 1,3,4-thiazdiazole-2arylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16. p. 413-421, 2008.

CARVALHO, V.; FERNANDES, L.; CONDE, T. et al. Antinoceptive Activity of *Stephanolepis hispidus* Skin Aqueous Extract Depends Partly on Opioid System Activation. **Marine Drugs**, v. 11, p. 1221-1234, 2013.

CARVALHO, A. S.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S. L. et al. Megazol and its bioisostere 4*H*-1,2,4-triazole: comparing the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities and their in vitro and in silico interactions with the *Trypanosoma brucei* nitroreductase enzyme. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109 (3), p. 315-323, 2014.

CASTRO, J. A.; DIAZ DE TORANZO, E. G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas disease). **Biomed. Environ Sci**. v.1, p.19-23, 1988.

CHAUVIÈRE, G.; BOITEILLE, B.; ENANGA, B. et, al. Synthesis and Biological Activity of Nitro Heterocycles Analogous to Megazol, a Trypanocidal Lead. **J. Med. Chem**. v.46, p.427-440, 2003.

COLLINS A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKÁ, M. et al. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**. v. 375, p. 183-193, 1996.

COLLINS, A. R. The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Mol. Biotechnol**. v.26, p.249-261, 2004.

COLLINS A. R.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutat. Res. Rev. Mutat. Res**. v. 759. p. 27–39, 2014.

CONTIJO, A. M. M. C., TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I.; HERNÁNDEZ-GARZA, F.; GARCÍA-PERÉZ, J. O. et al. Evaluation of DNA Single and Double Strand Breaks in Women with Cervical Neoplasia Based on Alkaline and Neutral Comet Assay Techniques. **J. Biomed. Biotechnol**. 2012.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Ins Oswaldo Cruz.** v.97(1), p.3-24, 2002.

DE MORAIS, M. A. Jr; DE CASSIA CAFÉ FERREIRA, R.; DE SOUZA FERREIRA, L.C. Mutagenic activation of CL64,855, na anti-Trypanosoma cruzi nitroderivant, by bacterial nitroreductases. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 4, p. 562-572, 1998.

DHAWAN, A., BAJPAYEE, M., PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 1, p. 5-32, 2009.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim Nova.** vol.32, n.9, p.2444-2457, 2009.

DIAS, J. C. P.; JUNIOR, A. N. R.; GONTIJO, E. D. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde.** v. 7.n. 25.p. 7-86, 2016.

DNDi, Iniciativa de Desenvolvimento de Drogas para Doenças Negligenciadas. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/azoles-e1224.html>>. <<http://www.dndi.org/pt/centro-de-documentacao/pres-releases/573-e1224.html>>. Acesso em: 25/10/2014.

DOBIÁS, L.; CERNÁ, M.; RÖSSNER, P. et al. Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. **Mutat. Res.** v.317, p.177-194, 1994.

DURAND R. E., OLIVE P. L. The comet assay: Alternatives for quantitative analyses. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.** v. 379. p. 130-131, 1997.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R.; The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, v.23(3), p.191-205, 2008.

EDWARDS, D. I. J. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 31, n. 1, p.9-20, 1993.

EHLHARDT, W. J.; BEAULIEU, B. B. Jr.; GOLDMAN, P. J. Nitroimidazoles: highly bactericidal analogues of 5-nitroimidazole drugs. **J. Med. Chem.** v. 31, p.323-329, 1988.

ENANGA, B.; BOUDRA, H.; CHAUVIERE, G. et al. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol, a new potent trypanocidal drug in animals. **Arzneimittel-Forschung** v. 49, n. 5, p. 441-447, 1999.

ENANGA, B.; NDONG, J. M.; BOUDRA, H. et al. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of megazol in a *Trypanosoma brucei gambiense* primate model of human African trypanosomiasis. Preliminary study. **Arzneimittel-Forschung**, v. 50, n.2, p. 158-162, 2000.

ENANGA, B.; ARIYANAYAGAM, M. R.; STEWART, M. L. et al. Activity of megazol, a trypanocidal nitroimidazole, is associated with DNA damage. **Antimicrob Agents Chemother.** v.47, n.10, p.3368-3370, oct. 2003.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research.** v. 147. p. 29-36, 1985.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat. Res.** v.455, p.81-95, 2000.

FERREIRA, R. C., FERREIRA, L. C. 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, 1986a.

FERREIRA, R. C., FERREIRA, L. C. Mutagenicity of CL 64855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug. **Mutat. Res.** v.17, p.11-15, 1986b.

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

FRANÇA R. R. F, CARVALHO A. S, BRANCO F. S. C, PINTO A. C, BOECHAT, N. Inibidores potentes da enzima estero1 14 α -desmetilase contra *Trypanosoma cruzi*. **Rev Virtual Quim.** v. 6. p. 1483-1516, 2014.

FRÖTSCHL, R. Experiences with the *in vivo* and *in vitro* comet assay in regulatory testing. **Mutagenesis.** v. 30. p. 51–57, 2015.

FUCHS, R.; STELZER, I.; DREES, C. M. P. et al. Modification of the alkaline comet assay with human mesenchymal stem cells. **Cell Biol. Int.** v. 36. p. 113–117, 2012.

GASCON, J; BERN, C; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop.** v.115. p.22-27, 2010.

HARTMANN, A., SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**. v.90, p.183-188, 1997.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T., Jr. ISHIDATE, M. An application of acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutat. Res.** v. 120, p. 241-247, 1983.

HUK, A.; COLLINS, A. R.; YAMANIL, N. E. et al. Critical factors to be considered when testing nanomaterials for genotoxicity with the comet assay. **Mutagenesis**. v. 30. p. 85–88, 2015.

HOTEZ, P. J.; DUMONTEIL, E.; WOC-COLBURN, L. et al. Chagas disease: “The new HIV/AIDS of the Americas”. **PLoS Negl Trop Dis**. v.6, 2012.

IARC, 2014. DISPONÍVEL
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol47/mono47-16.pdf>

IARMARCOVAI G. et al.. Genetic ation: a review of the literature. **Mutation Research**. v. 658. p. 215-233, 2008.

ICH. **Genotoxicity: specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals S2A**, 1996. CPMP/ICH/141/95. <http://www.ich.org>. Acesso em: 17/08/2014.

ICH. **Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals S2B**, 1997. <http://www.ich.org>. Acesso em: 17/08/2014.

ICH. **S2 (R1) Guidance for Industry. Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use**. June 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3330.011**: Ensaio Cometa. Rev. 8. Rio de Janeiro, 2015. 81 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35 (3), p. 167-172, 2000.

KRUSZEWSKI, M.; IWANENKO, T.; MACHAJ, E. K. et al. Direct use of the comet assay to study cell cycle distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation. **Mutagenesis**. v. 27. p. 551–558, 2012.

LANGIE, S.; CAMORON, K. M.; WALDRON, K. J. et al. Measuring DNA repair incision activity of mouse tissue extracts towards singlet oxygen-induced DNA damage: a comet-based *in vitro* repair assay. **Mutagenesis**. v. 26. p. 461–471, 2011.

LIMA, M. L. **Avaliação do potencial carcinogênico do Megazol, agente anti-chagásico, e obtenção de nanopartículas de poli(e-caprolactona) contendo Megazol**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LORGE, E.; HAYASHI, M.; ALBERTINI, S.; KIRKLAND, D. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. **Mutat. Res.** v.655, p.1-3, 2008.

LUCCHESI, G. **Globalização e regulação sanitária. Os rumos da vigilância sanitária no Brasil**. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; Rio de Janeiro, 2001.

LYNCH, A. M.; SASAKI, J. C.; ELESURU, R. et al. New and emerging technologies for genetic toxicity testing. **Environ Mol Mutagen.** v.52, p.205-223, 2011.

MAGALHÃES, J. L.; BOECHAT, N.; ANTUNES, A. M. S. Internalização de farmoquímicos & medicamentos para doenças tropicais negligenciadas: proposta de interação entre governo – universidade – empresa. **Quim. Nova**. v.35, n.3, p.654-660, 2012.

MARTINDALE. The Complete Drug Reference. Benzimidazole. **The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain**. Truven Health Analytics Inc. 2014.

MAILING, H. History of the science of mutagenesis from a personal perspective. **Environm. Mol. Mutagen.**, v.44, p. 372-388, 2004.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUNEZ-VERGARA, L. J. et al. Trypanosoma Cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurans derivatives. **Biochem Pharmacol.** v.6, p.999-1006, 2003.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VASQUEZ, P. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol.** v.146, p.601-620, 2007.

MELLO, F. V. C.; CARVALHO, A. S.; BASTOS, M. M.; BOECHAT, N. et al. Evaluation of genotoxic effects of new molecules with possible trypanocidal activity for Chagas disease treatment. **The Scientific World Journal**, v. 2013, Article ID 287319, p.1-8, 2013.

MCKENNA, D. J.; MCKEOWN, S. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, v. 23(3), p. 183-190, 2008.

MILLER, B.; ALBERTINI, S.; LOCHER, F. et al. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. **Mutat. Res.** v. 392. p. 45-59, 1997.

MILLER, B.; POTTER-IOCHER. Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the *in vitro* micronucleus test. **Mutat. Res.** v. 410, p. 81-116, 1998.

MITAL, A. Synthetic nitroimidazoles: biological activities and mutagenicity relationships. **Sci Pharm.** v.77, p.497-520, 2009.

MORETH, M.; ORNELAS, D.; OMES, C. R. B.; SOUZA, M. V. N. Nitroimidazóis-Uma promissora classe de substâncias para o tratamento da tuberculose. **Rev. Virtual Quim.** v.2, n.2, p.105-117, 2010.

MULLER, H. The production of mutations by X-rays. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.68, p.59. 1928.

NEGLECTED tropical diseases: becoming less neglected. **The Lancet**, v. 383, p. 1269, abr. 2014.

NESSLANY, F.; BRUGIER, S.; MOURIES, MA. et al. *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by megalol. **Mutat. Res.** v. 560, p.147-158, 2004.

NOVAIS, K. T. F.; NOVAIS, A. L. S.; BORGES, R. P. et, al. Otimização dos processos unitários envolvidos na síntese do megalol. **Rev. Bras. Farm.** 92(3), p.142-148, 2011.

OECD Guideline for the testing of chemicals. 487: *In vitro* mammalian cell micronucleus test. Adopted 26 September 2014a.

OECD Guideline for the testing of chemicals. 489: In vivo alkaline comet assay Adopted 26 September 2014b.

OLIVEIRA, M. F.;NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O. et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.37, n.3, p.209-228, jul-set. 2008.

PELLEGRI, V.; GORBI, G.; BUSCHINI, A. Comet assay on *Daphnia magna* in ecogenotoxicity testing. *Aquat. Toxicol.* v. 155. p. 261–268, 2014.

POÇA, K. S. **Avaliação do efeito genotóxico do megazol**. 2005. 81 f. Tese (Mestrado em Saúde Pública)-Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

POLI, P.; MELLO, M. A.; BUSCHINI, A. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of megazol, an anti-Chagas disease drug, assessed by different short-term tests. **Biochem. Pharmacol.** v.64, p.1617-1627, 2002.

PRESTON, R. J; HOFFMANN, G. R. Genetic Toxicology. In: CASARETT e DOULL'S. **Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 7. ed. EUA : The McGraw-Hill Companies, 2008. p. 381-414.

QUARESMA, B. M. C. S. **Síntese e avaliação tripanicida e mutagênica de novos nitroimidazóis substituídos com diferentes anéis azólicos**. 2015. 152 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas)-Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova.** v,26, n.4, p.550-555, 2003.

REY, L. Tripanossomíase por *Trypanosoma brucei* e doença do sono. In: REY L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Editora Guanabara Koogan, 2001. p. 200-14.

RICHARDSON, C.; WILLIAMS, D. A.; ALLEN, J. A. et al. **Analysis of data from *in vitro* cytogenetic assays, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data**. Kirkland, D. J. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, p. 141-154, 1989.

ROMANHA, A. J.; CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 105(2), p. 233-238, march 2010.

SALOMÃO, K.; SOUZA, E. M.; CARVALHO, S. A. et al. In vitro and In vivo activity of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives of megalol on trypanosome cruzi. **Antimicrob Agents Chemother.** v.54, p. 2023-2031, 2010.

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

SILVESTRI, R.; ARTICO, M.; MARTINO, G. et al. Synthesis, biological evaluation and binding mode of novel 1-[2-(diarylmethoxy) ethyl]-2-methyl-5-nitroimidazoles targeted at the HIV-1 reversed transcriptase. **J Med Chem.** v. 45. p. 1567-1576, 2002.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** v. 175. p. 184-191, 1988.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutat. Res.** v. 488. p. 151-169, 2001.

SOEIRO M, N. C.; DE CASTRO S. L. Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: *In vitro* and *in vivo* studies. **Open Med Chem J.** v. 5, p 21-30, 2011.

SPEIT G; HARTMANN A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods Mol Biol.** v. 314, p.275-286, 2006.

SPEIT G; KUHNER, S.; LINSENMEYER, R; SCHÜTZ, P. Does formaldehyde induce aneuploidy? **Mutagenesis.** v. 26 n.6, p.805-811, 2011.

SPERANDEO N. R., BRIÑÓN, M. C.; BRUN, R. Synthesis, antiprotozoal and cytotoxic activities of N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1,2-naphthoquinone-4-amino derivatives. **Il Farmaco.** v.59, p.431-435, 2004.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D. et al. Single cell gel Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TOXNET. Toxicology data network NIH. U. S. National Library of Medicine. CCRIS: NIFURTIMOX. Acesso: <<https://toxnet.nlm.nih.gov/>>

TURRENS, J. F.; WATTS Jr, B. P.; ZHONG, L. et al. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and antihelminthic imidazole derivatives. **Mol.Biochem.Parasitol.** v.82, p. 125-129, 1996.

TWEATS, D; TRUNZ, B. B; TORREELE, E. Genotoxicity of fexinidazole a drug candidate in clinical development for human African trypanomiasis (sleeping sickness). **Mutagenesis**, p. 1-10, 2012 Mutagenesis Advance Access published April 2012. doi:10.1093/mutage/ges015.

UNITING TO COMBAT NTDS. Delivering on promises and driving progress. [New York], 2014a. Disponível em: <http://unitingtocombatntds.org/sites/default/files/document/NTD_report_04102014_v4_singles.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2014.

URBINA, J. A.; Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica.** v. 115. p. 55–68, 2010.

URBINA J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. **J Eukaryot Microbiol.** v. 62, p. 149-156, 2014.

WADA, K.; YOSHIDA, D.; TAKAHASHI, N.; MATSUMOTO, K. Effects of seven chemicals on DNA damage in the rat urinary bladder: A comet assay study. **Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.** v. 769. p. 1-6, 2014.

VIJAYALAXMI; TICE, R. R.; STRAUSS, G. H. S. Assessment of radiation - induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single - cell gel electrophoresis technique. **Mutat. Res.**, v. 271, p. 243-252, 1992.

VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N. et, al., Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles. **Biochemical Pharmacology.** v. 57, p. 549–557, 1999.

WALSH J. S.; WANG, R.; BAGAN, E. et al. Structural alterations that differentially affect the mutagenic and antitrichomonal activities of 5-nitroimidazoles. **J. Med. Chem.** v.30, p.150-156, 1987.

WHO, World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 10/01/2016.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Rev. Mol. Med.** V. 11, p.31, 2009.

WITTE I.; PLAPERETTI, U.; WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the best science for human evaluation Part III: The Comet Assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences**, v. 97. n. 1. p. 21-26, 2007.

YASUYUKI, G.; MALCOLM, S. D.; KAWAZU, S. I. et al. Biased cellular locations of tandem repeat antigens in African trypanosomes. **Biochem. and Biophysical Res Comm.**, v. 405,p. 434-438, 2011.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; MORAES, C. B. et al. Drug Discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 109(6), p. 828-833, 2014.

ANEXO 1

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo da genotoxicidade in vitro de substâncias nitroimidazólicas como instrumento para busca de novos agentes tripanomicidas.

Pesquisador: Helena Pereira da Silva Zamith

Versão: 3

CAAE: 41684815.3.0000.5248

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 008657/2015

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Informamos que o projeto Estudo da genotoxicidade in vitro de substâncias nitroimidazólicas como instrumento para busca de novos agentes tripanomicidas. que tem como pesquisador responsável Helena Pereira da Silva Zamith, foi recebido para análise ética no CEP Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC em 11/02/2015 às 15:37.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

APÊNDICE A

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEP Fiocruz/IOC
 Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz
 Avenida Brasil 4.036, sala 705 (Expansão) Manguinhos Rio de Janeiro - RJ
 CEP: 21.040-360 Tel.: (21) 3882-9011 Tel./Fax: (21) 2561-4815
 e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br Skype: cep_fiocruz_ioc

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Documento em 2 vias, assinado por cada participante voluntário do estudo e pelo pesquisador responsável)

Eu,....., tendo sido convidado(a)

a participar como voluntário(a) do estudo intitulado “Estudo da Genotoxicidade *in vitro* de Substâncias Nitroimidazólicas como Instrumento para Busca de Novos Agentes Tripanomicidas”, recebi através da pesquisadora responsável, Dra. Helena Pereira da Silva Zamith do Setor de Citotoxicidade e Genotoxicidade do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, as seguintes informações que possibilitaram meu pleno entendimento quanto aos detalhes relevantes do presente estudo:

O estudo tem como objetivo avaliar se as substâncias nitroimidazólicas análogas do megazol com atividade tripanomicida (como por exemplo, contra o agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* e da doença do sono, *T. cruzi*) causam citotoxicidade e/ou genotoxicidade ao homem. Para responder à esta questão, há a necessidade, de se testar estas substâncias *in vitro* em células de sangue humano (coletado por punção venosa) para verificar se as substâncias causarão morte das células ou retardo do ciclo celular (citotoxicidade) ou dano ao DNA (genotoxicidade/mutagenicidade). Porém, se for detectado danos no DNA das células sanguíneas que não foram tratadas, a amostra de sangue coletada não poderá ser utilizada, e deverei ser informado;

Estou ciente de que o voluntário participante do estudo poderá ser de ambos os sexos; que é preciso preencher requisitos como de idade, que deverá ser próxima dos 30 +/- 3 anos; que não tenha sido exposto a raios-X nos últimos 3 meses antes

da doação de sangue, que não seja fumante, que preferencialmente não consuma bebidas alcoólicas e que não esteja fazendo uso de medicamentos no momento;

□ Os resultados deste estudo possibilitarão a identificação de substâncias nitroimidazólicas tripanomicidas, com eficácia previamente conhecida contra as formas tripomastigotas, ou seja, de alto poder infectante, de *T. cruzi* e *T. brucei*, porém com ausência de atividades citotóxica e genotóxica em células sanguíneas humanas. Desta forma espera-se contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos nitroimidazólicos a serem empregados no tratamento das tripanossomíases, tais como, doenças de Chagas e do sono consideradas doenças tropicais negligenciadas. Estima-se que, mundialmente, cerca de 27 milhões de pessoas estejam infectadas pelos protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* sp resultando em considerável morbidade e mortalidade especialmente, em países em desenvolvimento, apresentando grande importância em termos de saúde pública, pois as iniciativas ainda não foram suficientes por parte dos órgãos competentes para desenvolver medicamentos eficazes e mais seguros para a população afetada;

□ O estudo terá uma duração de 2 anos;

□ Nesse estudo poderá ser doado um volume sanguíneo em torno de 5 mL para o caso de realização do ensaio de citotoxicidade (determinação de letalidade celular), previamente ao ensaio de genotoxicidade Cometa para avaliação de quebras de fita de DNA; cerca de 10 mL para o caso de realização do ensaio Cometa e cerca de 16 mL para o caso de realização dos ensaios simultâneos de citotoxicidade (índice de replicação) e do ensaio de mutagenicidade de micronúcleo que detecta fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros;

□ Como voluntário, participarei da etapa de coleta sanguínea como doador para realização dos ensaios de citotoxicidade, Cometa e/ou micronúcleo;

□ Os riscos, incômodos e desconfortos físicos que poderei sentir com a minha participação são os normais de uma doação sanguínea, atentando-se para o fato de que em doações sanguíneas, só são utilizadas seringas e agulhas descartáveis;

Que as informações obtidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto;

- Que o estudo não acarretará nenhuma despesa como participante da pesquisa;
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo;
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;
- Que a equipe da pesquisa estará a minha disposição para qualquer esclarecimento sobre o estudo e sobre a minha participação;
- Que eu receberei uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de igual teor datada e assinada por mim e pela pesquisadora responsável pela pesquisa;

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço do(a) participante voluntário(a)

Rua/Nº/Complemento:

Bairro/CEP/Cidade:

Telefone:

Nome e endereço da pesquisadora responsável pela pesquisa

Dra Helena Pereira da Silva Zamith

Setor de Citotoxicidade e Genotoxicidade

Laboratório de Toxicologia (Bloco 7 – sala 108 A)

Departamento de Farmacologia e Toxicologia

INCQS/FIOCRUZ

Tel.: (21) 3865-5278

Rio de Janeiro,

Assinatura ou impressão
datiloscópica do(a) voluntário(a)
(Rubricar as demais páginas)

Nome e Assinatura da responsável pelo estudo
(Rubricar as demais páginas)

APÊNDICE B

QUESTIONÁRIO PARA PARTICIPAÇÃO COMO DOADOR PARA O ENSAIO
COMETA E O ENSAIO DE MICRONÚCLEO.

Nome:

Endereço:

Telefones:

Local de trabalho e/ou estágio:

1. Qual é a sua idade?
2. É fumante? Qual a frequência diária?
3. Com que frequência consome bebidas alcoólicas?
4. Quando foi a sua última exposição a raios-X?
5. Está atualmente fazendo uso de algum medicamento?

APÊNDICE C
PREPARO DAS SOLUÇÕES DO ENSAIO COMETA

1- Solução PBS

-Cloreto de sódio	(PM 58,44)	32,0 g
-Cloreto de potássio	(PM 74,55)	0,8 g
-Fosfato de sódio dibásico	(PM 141,96)	4,6 g
-Fosfato de potássio monobásico	(PM 136,09)	0,8 g
-Água desionizada	qsp	4,0 L

- Dissolução com agitação magnética;
- Ajuste do pH a aproximadamente 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N;
- Esterilização por autoclavação durante 30 min. Pode-se também esterilizar por filtração a vácuo (membrana de 0,22 μm).

2- Solução de agarose de ponto de fusão normal (agarose PFN) 1,5%

- Para 200 lâminas, adicionou-se 6g de agarose PFN (Sigma A-9918) a 400 mL de solução PBS e aqueceu-se com o auxílio de bico de Bunsen a uma temperatura próxima à ebulição até a sua dissolução;
- A agarose PFN 1,5% foi fervida três vezes antes de ser usada no ensaio.

3- A solução de agarose PFN 1,5% foi usada para o revestimento das lâminas (camada inferior de agarose) de acordo com o procedimento abaixo:

- As lâminas foram limpas com lenço de papel embebido em etanol absoluto;
- As lâminas limpas foram mergulhadas por pouco tempo na solução de agarose PFN 1,5% quente mantida em banho-maria a uma temperatura de $60 \pm 1^\circ\text{C}$. A agarose deve alcançar até a metade da parte fosca da lâmina para assegurar que a mesma fique aderida adequadamente à lâmina;

- o lado posterior da lâmina foi seco, e em seguida, a lâmina foi colocada rapidamente sobre a estante na posição horizontal. Essa etapa deve ser realizada rapidamente para que se possa garantir uma boa distribuição da agarose;
- as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente *overnight* para secarem;
- após secagem as lâminas foram armazenadas em caixas à temperatura ambiente por tempos prolongados (1 ano) até o dia do uso.

4- Solução de agarose de baixo ponto de fusão (agarose BPF) 0,5%

- Dissolução de 0,1g de agarose BPF (Sigma A-9414) em 20 mL de PBS pelo aquecimento com bico de Bunsen a uma temperatura próxima à da ebulição até a completa solubilização da agarose;
- distribuição da agarose em volumes de 5 mL em erlenmeyer de 25 mL e manutenção na geladeira até o momento do uso;
- no ensaio, a agarose BPF 0,5% deve ser aquecida rapidamente até a sua completa dissolução;
- após a dissolução, a agarose deve ser resfriada colocando-a em banho-maria a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

A solução de agarose BPF 0,5% foi empregada para a preparação da segunda camada de agarose conforme procedimento abaixo:

- em microtubo plástico de tampa achatada (0,6mL) adicionou-se 5 μL da suspensão celular ou mistura de incubação a 120 μL de agarose BPF 0,5% mantida em banho-maria a 37°C ;
- homogeneizou-se uma vez para completa distribuição das células em agarose BPF 0,5%;
- em seguida, adicionou-se 120 μL da mistura sobre a lâmina previamente revestida pela agarose PFN 1,5%;
- imediatamente após, colocou-se lamínula sobre a lâmina, evitando-se a formação de bolhas de ar;
- colocou-se em geladeira (4°C a 10°C) as lâminas em estantes por aproximadamente 5 min, até que a camada de agarose endurecesse;

- após cerca de 5 min, removeu-se a lamínula, deslizando-a delicadamente sobre a camada de agarose e logo em seguida, mergulhou-se lentamente a lâmina em recipiente contendo solução para lise celular gelada, recentemente preparada e protegida da luz;
- as lâminas foram mantidas em geladeira (4°C a 10°C) *overnight*;
- no dia seguinte, duas lâminas foram preparadas por cultura de cada grupo experimental.

5- Solução para lise

a) Solução de lise 1:

- Cloreto de sódio 2,5 M.....(PM 58,44).....146,1 g
- EDTA dissódico 100mM....(PM 372,24).....37,2 g
- Tris 10 mM.....(PM 121,14).....1,2 g
- Água deionizada.....850 mL

b) Solução de lise 2 (final):

- Triton X – 100.....(PM 646,87).....1 mL
- DMSO.....(PM 78,13).....10 mL
- Solução de lise 1.....89 mL

6- Solução tampão alcalina para eletroforese (NaOH 300 mN/EDTA 1mM)

a) Solução de hidróxido de sódio (10 N)

- Hidróxido de sódio (PM 40) 40 g
- Água desionizada 100 mL

- em capela química, adição lenta da água ao pó em béquer;
- após cada adição, resfriamento do béquer em banho de gelo;
- a solução deve ser usada no prazo máximo de 2 semanas após a sua preparação;
- manutenção da solução à temperatura ambiente.

b) solução de EDTA 200 mM

- EDTA dissódico (PM 372,24) 14,89 g
- Água desionizada qsp 200 mL
- c) dissolução com agitação magnética;
- d) ajuste do pH da solução a aproximadamente 10 usando NaOH 10N;
- e) manutenção à temperatura ambiente.

c) solução tampão (NaOH 300 mN/EDTA 1mM)

- Hidróxido de sódio 10 N45 mL
- EDTA dissódico 200 mM7,5 mL
- Água deionizada qsp.....1500 mL

A solução deve ser preparada no dia do ensaio e mantida em geladeira por pelo menos 2h antes do seu uso.

7- Solução tampão para neutralização

- Tris 0,4 M (PM 121,14).....48,5 g
- Água deionizada qsp.....1000 mL

8- Solução corante de brometo de etídio 200 µg/mL (10 X concentrada):

- Brometo de etídio (PM 394,3).....0,005 g
- Água deionizada25 mL

Solução de brometo de etídio 20 µg/mL (1 X concentrada):

- Solução de brometo de etídio 200 µg/mL.....0,25 mL
- Água deionizada2,25 mL

- Solução 1X concentrada preparada no dia do experimento; adição de 30 uL por lâmina

9- Solução corante de diacetato de fluoresceína (FDA) e brometo de etídio

a) Solução A - FDA 5 mg/mL:

- FDA (PM 416,4).....0,025 g
- Acetona.....5 mL

b) Solução B - Brometo de etídio 200 µg/mL:

- Brometo de etídio (PM 394,3).....0,005 g
- Solução PBS.....25 mL

c) Solução de FDA 30 µg/mL e de brometo de etídio 8 µg/mL:

- Solução A.....30 µL
- Solução B.....200 µL
- Solução PBS.....4,8 mL

- A solução deve ser preparada no dia do teste para determinação da viabilidade celular;
- 100 µL da solução corante deve ser adicionada a 100 µL de suspensão celular;
 - * 50 µL da mistura deve ser adicionada à lâmina microscópica seguida de colocação de lâmina para análise

10- Solução de metanosulfonato de metila (MMS): controle positivo no ensaio Cometa

- MMS PM 110,13; d = 1,300

a) Solução A - MMS 8×10^{-2} M (80 mM):

- MMS.....20 µL
- PBS.....3 mL

b) Solução B - MMS 8×10^{-4} M (0,8 mM):

- Solução A.....10 µL
- PBS.....990 µL

No ensaio Cometa, a solução B - MMS 0,8 mM (50 µL) foi diluída em 200 µL de sangue resultando na concentração final de 160 µM

APÊNDICE D
PREPARO DAS SOLUÇÕES DO ENSAIO DE MICRONÚCLEO

1- Preparação de solução KH₂PO₄ (0,3 M)

- KH₂PO₄ (PM 136,09).....10,21 g
- Água destilada.....250 mL

2- Preparação de solução Na₂ HPO₄ (0,3 M)

- Na₂ HPO₄ (PM 142,07).....10,66 g
- Água destilada.....250 ml

3- Solução corante de laranja de acridina.

a) Solução estoque de laranja de acridina (1mg/mL)

- Laranja de acridina (PM 370,0).....50 mg
- Agua destilada.....50 mL

b) Solução de laranja de acridina (concentração de uso: 60 µg/mL)

- Solução estoque (1mg/mL).....6 mL
- KH₂PO₄ 0,3 M.....10 mL
- Na₂HPO₄ 0,3 M.....10 ml
- Água destilada.....74 mL

4- Meio RPMI 1640 com L-glutamina e 25 mM de HEPES sem NaHCO₃

- 16,2 g/pacote. Adicionar 2g/L de NaHCO₃ e ajustar o pH na faixa de 7,0 - 7,4

5- Preparação de solução de Mitomicina C

a) Preparação da solução de MMC 50 µg/mL (solução 1)

- Solução estoque (500 µg/mL).....15 µL
- Água destilada.....135 µL

b) Preparação da solução de MMC 50 µg/mL (solução 2)

- Solução 1 (50 µg/mL).....50 µL

- Água destilada.....50 µL

6- Preparação de solução de Colcemid 0,001% (10 µg/mL): COL1

- Demecolcine (PM 371,4).....5 mg

- Solução de NaCl 0,9%.....500 mL

a) Preparação da solução de Colcemid 1 µg/mL (COL2)

- Solução de COL1 (10 µg/mL).....100 µL

- Água destilada.....900 µL