



Dissertação de Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e
Forense

Síntese e avaliação da
genotoxicidade de um
derivado tioxantónico

Trabalho realizado sob a orientação do professor doutor
Carlos Manuel Afonso

Davide Costa Vieira

Setembro, 2010

Declaração relativa à reprodução:

É autorizada a reprodução integral desta dissertação para efeitos de investigação mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Agradecimentos.

No âmbito da realização desta dissertação, gostaria de agradecer o precioso contributo de todas as pessoas que ao longo último ano permitiram que esta se tornasse uma realidade:

Ao professor doutor Carlos Afonso, meu orientador neste trabalho, pelo tempo dispendido, pela disponibilidade e paciência revelada, pelo espírito crítico, pela supervisão e orientação desta dissertação.

À professora doutora Emília Sousa, pelo acompanhamento de todo o processo de síntese dos compostos e pelo apoio prestado.

Ao professor doutor Félix Carvalho e à professora doutora Alice Silva, pelos conhecimentos transmitidos para a execução do ensaio do micronúcleo e pela prontidão com que foram esclarecendo as minhas dúvidas.

À Ana Sara, pela sua colaboração ao longo de todas as fases deste trabalho. Ao Henrique Nascimento, pelo seu importante contributo na análise estatística dos resultados.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e aos departamentos de Química Orgânica e Bioquímica, por me terem proporcionado as condições necessárias à realização desta dissertação.

À professora doutora Maria Lurdes Bastos, coordenadora do mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense, e aos restantes professores que leccionaram neste mestrado e que me incutiram um interesse cada vez maior na área da toxicologia. Aos meus colegas de mestrado, por toda a ajuda prestada, em especial à Helena, Maria João e Sílvia.

Aos meus familiares e aos meus amigos, pelo incentivo prestado ao longo destes últimos 2 anos.

A todos, o meu sincero obrigado.

Resumo.

O processo de descoberta, planeamento e desenvolvimento de novos fármacos constitui um longo caminho ao longo do qual é fundamental sintetizar e avaliar as características e propriedades de um número frequentemente elevado de substâncias. Neste processo, a avaliação da toxicidade desempenha cada vez mais um papel relevante e necessário em todas as fases que o constituem. A realização de ensaios de toxicidade em fases precoces, como as da descoberta e planeamento, permitem reduzir a probabilidade de compostos promissores falharem em etapas mais avançadas e dispendiosas. O ensaio do micronúcleo constitui uma das metodologias mais utilizadas para a avaliação da genotoxicidade e foi aqui usado para estudar uma tioxantona com uma cadeia lateral aminada, a TXA1, a qual demonstrou possuir actividade anti-cancerígena promissora em ensaios *in vitro*. Em primeiro lugar desenvolveu-se o processo de síntese da TXA1 por uma reacção de *N*-arilação de uma tioxantona. Foram ensaiadas várias condições reaccionais de modo a encontrar a que proporcionava maior rendimento. A TXA1 foi então convertida no cloridrato respectivo, TXA1.HCl, por adição de HCl 37%. As reacções apresentadas permitem a obtenção de quantidades suficientes para a realização do ensaio de genotoxicidade, aqui realizado, e também para posteriores ensaios de actividade e determinação de parâmetros físico-químicos necessários. A TXA1.HCl, sendo solúvel em água, viabilizou e permitiu o estudo de genotoxicidade desta substância. Assim, efectuou-se o ensaio do micronúcleo em ratinhos (murganhos), o qual demonstrou que, para doses iguais ou superiores a 25 mg/Kg, este composto era capaz de provocar um aumento da frequência de eritrócitos micronucleados. Para retirar conclusões mais definitivas sobre a genotoxicidade deverão ser efectuados no futuro outros ensaios de natureza diferente que confirmem os dados obtidos.

Palavras-chave: tioxantonas; síntese de xantonas; antitumoral, genotoxicidade, micronúcleo.

Abstract.

The process of discovery, planning and development of new drugs is a long road along which it is essential to synthesize and evaluate the characteristics and properties of often large numbers of substances. In this process, toxicity assessment plays an increasingly important and necessary role in all phases that constitute it. Toxicity evaluation in early stages, such as the discovery and planning, will reduce the likelihood of promising compounds fail in advanced and expensive stages. The micronucleus assay is one of the most used methodologies for assessing the genotoxicity and was used here to study a thioxanthone with an aminated side chain, TXA₁, which has shown promising anti-cancerigenous activity *in vitro*. Firstly, was developed a process of synthesizing TXA₁ by a reaction of N-arylation of a thioxanthone. We tested various reaction conditions in order to find the largest yields. The TXA₁ was then converted into its hydrochloride, TXA₁.HCl, by adding 37% HCl. The reactions presented allow obtaining sufficient quantities for the genotoxicity test held here, and also for subsequent activity assays and determination of physicochemical parameters needed. The TXA₁.HCl, which is soluble in water, allowed the study of genotoxicity of this substance. Thus took place the micronucleus assay in mice, which showed that for doses greater than or equal to 25 mg / kg, this compound was capable of causing an increased frequency of micronucleated erythrocytes. To draw more definitive conclusions on genotoxicity, other tests of a different nature should be made in the future to confirm the data obtained.

Keywords: thioxanthone; synthesis of xanthenes; antitumor; genotoxicity, micronucleus.

Índice.

Agradecimentos.	iii
Resumo.	v
Abstract.	vii
Índice de figuras.	xi
Índice de tabelas.	xiii
Lista de abreviaturas e símbolos.	xv
1. Introdução e objectivos.	19
1.1- <i>Xantonas: estrutura e propriedades biológicas.</i>	21
1.2- <i>Actividade antitumoral das tioxantonas.</i>	28
1.2.1- Propriedades anti-cancerígenas da lucantona e hicantona.	28
1.2.2- Outras tioxantonas com propriedades anti-cancerígenas.	33
1.3- <i>O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.</i>	38
1.3.1- O processo de descoberta e planeamento de novos fármacos.	39
1.3.2- O processo de desenvolvimento de novos fármacos.	44
1.4- <i>A importância da avaliação da toxicidade no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.</i>	47
1.4.1- A avaliação toxicológica ao longo das etapas de descoberta e optimização de um composto líder.	47
1.4.2- A avaliação toxicológica na fase pré-clínica do desenvolvimento.	50
1.5- <i>O ensaio do micronúcleo no estudo de potencial genotoxicidade.</i>	57
1.5.1- Características gerais.	57
1.5.2- Aplicações do ensaio do micronúcleo.	63
1.5.3- Optimização e automatização do ensaio do micronúcleo.	65
1.6- <i>Objectivos.</i>	70
2. Resultados e Discussão.	71
2.1- <i>Síntese da TXA1.</i>	73

2.2-	<i>Síntese do cloridrato de TXA1 (TXA1.HCl).</i>	78
2.3-	<i>Caracterização estrutural.</i>	80
2.4-	<i>Avaliação da genotoxicidade (ensaio do micronúcleo).</i>	83
3.	Parte experimental.	89
3.1-	<i>Reagentes, solventes e métodos gerais.</i>	91
3.2-	<i>Síntese da TXA1.</i>	91
3.2.1-	<i>Síntese A.</i>	91
3.2.2-	<i>Síntese B.</i>	92
3.3-	<i>Síntese da TXA1.HCl.</i>	92
3.4-	<i>Avaliação da genotoxicidade (ensaio do micronúcleo).</i>	93
3.5-	<i>Análise estatística.</i>	94
4.	Conclusões.	95
5.	Bibliografia.	99
	Anexos	113

Índice de figuras.

Figura 1- A estrutura base das xantonas.	21
Figura 2- Estrutura da mangiferina.	22
Figura 3- Estrutura do noratirol.	22
Figura 4- Estrutura da daviditina A.	23
Figura 5- Estrutura do DMXAA.	24
Figura 6- Estrutura da psorospermina.	25
Figura 7- Mecanismo de intercalação da psorospermina (assinalada com um círculo) na cadeia de DNA. (adaptado de 21).	26
Figura 8 - O mangostão (adaptado de 25) e a estrutura do α -mangostin.	27
Figura 9- Estrutura da garcinona E.	27
Figura 10- A estrutura base das tioxantonas.	28
Figura 11- Estrutura da lucantona.	28
Figura 12- Estrutura da hicantona.	29
Figura 13- Mecanismo de reparação do DNA por excisão das bases (adaptado de 52).	32
Figura 14- Estrutura da acronicina.	33
Figura 15- Estrutura do pirano [2,3-c]tioxanten-7-ona.	34
Figura 16-- Estrutura do pirano [3,2-b]tioxanten-6-ona.	34
Figura 17- Estrutura do SR233377.	35
Figura 18- Estrutura do SR271425.	36
Figura 19- Estruturas do SR233374, SW68210 e SW71425.	37
Figura 20- Esquema resumido do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (adaptado de 69).	38
Figura 21- Um sistema de HTS (adaptado de 74).	41
Figura 22- Exemplos de fármacos que apresentam uma cadeia amínica: I-Metotrexato (acção antitumoral) ; II- Nortriplitina (acção antidepressiva) ; III- Pseudoefedrina (acção anti-histamínica).	44
Figura 23- Análise de cromossomas na metafase marcados por FISH. A figura da esquerda mostra uma célula sem aberrações cromossómicas enquanto a figura da direita mostra a existência de uma translocação cromossómica indicada pela seta (adaptado de 106).	57
Figura 24- Esfregaço sanguíneo corado com corante de Giemsa, no qual se observam alguns eritrócitos com micronúcleos (assinalados com uma seta) (adaptado de 109).	58

Figura 25- Esquema representativo da formação dos micronúcleos, sendo um deles formado devido à perda de um cromossoma inteiro e outro devido à perda de fragmentos cromossómicos (adaptado de 108).	59
Figura 26- Cinética da formação dos micronúcleos nos eritroblastos da medula óssea (adaptado de 115).	60
Figura 27- Resultado da associação do ensaio do micronúcleo com a técnica de FISH: linfócito binucleado com um micronúcleo sem centrómero (à esquerda) e linfócito binucleado com um micronúcleo com centrómero e assinalado com uma seta (à direita) (adaptado de 125).	66
Figura 28- Sistema de análise de imagens para avaliação dos eritrócitos micronucleados (adaptado de 127).	67
Figura 29- Representação esquemática do funcionamento (à esquerda) de um citómetro de fluxo (à direita) (adaptado de 129 e 130).	68
Figura 30- Estrutura base da TXA1.	70
Figura 31- Esquema geral da síntese de tioxantona aminadas por substituição nucleofílica aromática.	73
Figura 32- Mecanismo da substituição nucleofílica aromática. (adaptado de 135).	73
Figura 33- Esquema do mecanismo da reacção catalisada pelo cobre (Cu) (adaptado de 137).	75
Figura 34- Procedimento adoptado para a purificação da TXA1.	77
Figura 35- Esquema de formação da TXA1.HCl.	79
Figura 36- Procedimento adoptado para a síntese e isolamento da TXA1.HCl.	79
Figura 37- Esfregaço de sangue periférico corado pela técnica de Wright em que é possível observar a presença de um eritrócito micronucleado (indicado pela seta).	84
Figura 38- Análise de variação da percentagem de eritrócitos micronucleados no sangue periférico de acordo com a dose de TXA1.HCl administrada.	85
Figura 39- Esfregaço de sangue periférico corado com azul-de-metileno Novo e no qual é possível observar a presença de reticulócitos (indicados pelas setas).	86
Figura 40- Análise de variação da percentagem de reticulócitos no sangue periférico de acordo com a dose de TXA1.HCl administrada.	87

Índice de tabelas.

Tabela 1- Características gerais de todas as fases dos ensaios clínicos (adaptado de 79).	46
Tabela 2- Síntese da TXA1: reagentes, condições e resultados obtidos.	76
Tabela 3- Dados da análise por espectroscopia no IV da TX, TXA1 e TXA1.HCl.	80
Tabela 4- Dados da análise por ¹ H RMN da TX, TXA1 e TXA1.HCl.	82
Tabela 5- Resultados do ensaio do micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico para as diferentes doses testadas de TXA1.HCl.	84
Tabela 6- Resultados da contagem dos reticulócitos no sangue periférico para as diferentes doses testadas de TXA1.HCl.	86

Lista de abreviaturas e símbolos.

^1H RMN: Ressonância magnética nuclear de próton.

A1: Amina primária.

ADMA: Dimetilarginina assimétrica.

ADME: Absorção, distribuição, metabolização e eliminação.

ADMET: Absorção, distribuição, metabolização, eliminação e toxicidade.

ADP: Adenosina difosfato.

ANOVA: *Analysis of variance*.

ATP: Adenosina trifosfato.

CCF: Cromatografia em camada fina.

CDCl_3 : Clorofórmio deuterado.

CEQUIMED: Centro de Química Medicinal.

CHCl_3 : Clorofórmio.

COX: Cicloxigenase.

Cs_2CO_3 : Carbonato de céσιο.

Cu_2O : Óxido de cobre (I).

d: Duplete.

dd: Duplo duplete.

DMXAA: 4-ácido acético-5,6-dimetilxantenona.

DNA: Ácido desoxirribunucleico.

D_2O : Água deuterada.

ED_{50} : Dose eficaz mínima para 50% da população.

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético.

Et_2O : Éter etílico.

FISH: *Fluorescence in Situ Hybridisation*; Híbridização *in situ* com fluorescência.

GI₅₀ : Concentração necessária para inibir 50 % do crescimento celular.

GRE: Grupo retirador de electrões.

HCl: Ácido clorídrico.

HTS: *High Throughput Screening*; Rastreo massivo de compostos.

ICH: International Conference of Harmonization; Conferência Internacional para a Harmonização.

IC₅₀: Concentração necessária para inibir 50% da actividade celular.

IV: Infravermelho.

J: Constante de acoplamento.

KBr: Brometo de potássio.

K₂CO₃: carbonato de potássio.

K₃PO₄: fosfato de potássio.

LD₅₀: Dose letal para 50% da população.

LSD: *Latest significance variance*.

MeOH: Metanol.

Me₄Si: Tetrametilsilano.

MGMT: Metilguaninametiltransferase.

mRNA: RNA mensageiro.

NaOH: Hidróxido de sódio.

Na₂SO₄: Sulfato de sódio.

NMP: N- metil 2-pirrolidona.

NOAEL: *No observed adversed effect level*; Dose máxima para o qual não se observam efeitos adversos.

Nu: Nucleófilo.

PAF: Factor activador das plaquetas.

q: Quadrupeto.

P: Correlação de Pearson.

RMN: Ressonância magnética nuclear.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNAi: RNA de interferência.

s: Singleto.

sl: Singleto largo.

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*.

t: Tripleto.

TNF α : Factor necrosante tumoral α .

TX: Tioxantona halogenada.

TXA1: Tioxantona aminada 1.

TXA1.HCl: Cloridrato da tioxantona aminada 1.

TXOMe: Derivado metoxilado da tioxantona.

δ_H - Deslocamento químico.

1. Introdução e objectivos.

1. Introdução e objectivos.

1.1- Xantonas: estrutura e propriedades biológicas.

As xantonas são substâncias que apresentam a estrutura base igual à representada na figura 1 (1). Trata-se do núcleo xantónico, também conhecido por 9-xantenona ou dibenzo γ -pireno, que é tricíclico e planar (2).

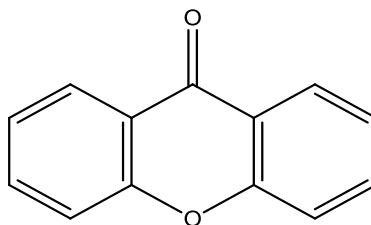


Figura 1- A estrutura base das xantonas.

Tendo em conta a natureza dos substituintes presentes na estrutura da dibenzo γ -pirena as xantonas de origem natural podem ser divididas em: xantonas oxigenadas simples, xantonas glicosiladas, xantonas preniladas e seus derivados, dímeros xantónicos, xantonolignóides e xantonas de outros tipos. Por sua vez, as xantonas de origem sintética podem apresentar desde grupos funcionais mais simples como hidroxilos, metoxilos, metilos, carboxilos, até substituintes mais complexos como epóxidos, azóis, metildienobutirolactonas, aminoalcoóis, sulfamoilos, ácidos metiltiocarbóxicos ou dihidropiridinas (3).

O interesse por esta classe de compostos encontra-se associado às diversas propriedades farmacológicas demonstradas quer pelas xantonas de origem natural, quer pelos derivados sintéticos (3). Assim, têm sido detectadas xantonas com diversas actividades nomeadamente acção anti-hipertensora, anti-oxidante, anti-trombótica ou anticancerígena (4). As diferentes propriedades biológicas apontadas às xantonas encontram-se relacionadas com a sua estrutura: o núcleo tricíclico e o tipo e posição dos diversos substituintes (1).

As xantonas encontram-se muitas vezes associadas a propriedades anti-oxidantes (3). Compostos como a mangiferina (figura 2) demonstram capacidade de captarem radicais livres, nomeadamente os aniões superóxido e os radicais hidroxilo ou peróxido (5). Para além disso, apresentam a capacidade de inibir a peroxidação lipídica a nível cerebral, hepático e cardiovascular o que permite explicar as propriedades cardioprotectoras e hepatoprotectoras associadas a esta substância (6).

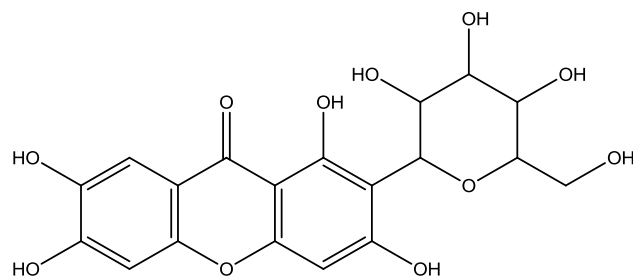


Figura 2- Estrutura da mangiferina.

As xantonas apresentam também acção anti-inflamatória, provocando uma redução da síntese de alguns prostanóides por inibição da actividade da cicloxigenase (COX) (7). O noratirol (figura 3) é um derivado xantónico que demonstrou propriedades anti-inflamatórias mediadas parcialmente pela supressão da desgranulação dos mastócitos. As xantonas são ainda responsáveis pela diminuição dos níveis do factor necrosante tumoral α (TNF α), uma citoquina pro-inflamatória (5).

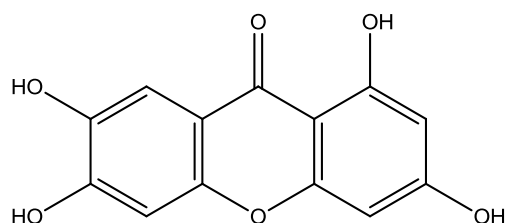


Figura 3- Estrutura do noratirol.

Outra das propriedades associadas às xantonas e respectivos derivados é a capacidade de inibição da agregação plaquetária e acção anti-trombótica (8). As xantonas demonstram capacidade de inibirem a agregação plaquetária e a libertação de adenosina trifosfato (ATP) induzida por diversos agonistas como a adenosina difosfato (ADP) ou o ácido araquidónico (9). Os efeitos inibitórios da agregação plaquetária provocada por esta classe de compostos poderão estar relacionados com a inibição da formação do tromboxano via COX (9), existindo ainda xantonas que demonstraram ser capazes de inibir o receptor do PAF (factor activador das plaquetas, que medeia a sua agregação) e a ligação do PAF às plaquetas de coelhos em ensaios *in vitro* (10).

Vários derivados xantónicos, nomeadamente o noratirol, têm demonstrado propriedades anti-hipertensoras interessantes actuando como vasodilatadores. O influxo de cálcio (Ca²⁺) provocado quer pela noradrenalina ou por elevados níveis de potássio (K⁺) é inibido pelo noratirol de uma forma dependente da concentração o que sugere que este

1. Introdução e objectivos.

poderá actuar por bloqueio dos canais de Ca^{2+} envolvidos na vasoconstrição da artéria aorta (8).

Recentemente, os efeitos cardioprotectores da xantonas têm despertado particular atenção. Estas têm demonstrado efeitos benéficos no tratamento de doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, doença isquémica cardíaca, hipertensão e trombooses. As propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias, antitrombóticas e anti-hipertensoras explicam em parte os efeitos protectores cardíacos associados às xantonas. No entanto, estas apresentam ainda outras características que permitem explicar a utilidade destas no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares (8).

Estudos efectuados com um derivado xantónico, a dauditina A (figura 4), demonstraram que esta apresenta a capacidade de atenuar a inibição do relaxamento endotelial provocado por agentes como ao lisofosfatidilcolina (11). Um pré-tratamento com esta substância permitiu atenuar a disfunção endotelial na artéria aorta e a elevação dos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA), uma enzima com acção inibitória sobre óxido nítrico sintetase e cuja acção poderá estar associada à ocorrência de perturbações endoteliais, provocados pela injeção da lisofosfatidilcolina *in vivo* (12, 13).

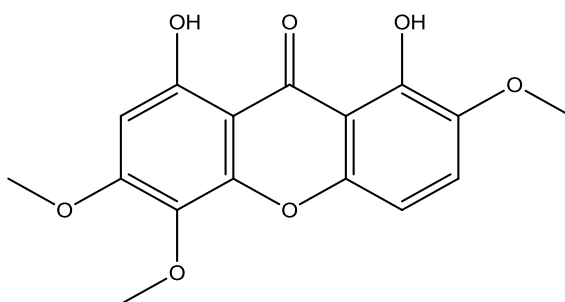


Figura 4- Estrutura da dauditina A.

Novos agentes quimioterápicos com mecanismos bioquímicos distintos para o tratamento do cancro em geral, e da resistência tumoral em particular, constituem necessidades prementes do arsenal terapêutico. Deste modo, assume especial importância o desenvolvimento de uma nova classe de compostos antitumorais com poucos efeitos adversos comparativamente com os compostos utilizados na terapêutica actual (3). Assim, os últimos tempos têm assistido a um aumento do interesse na procura de derivados xantónicos com essas características (14).

As propriedades antitumorais das xantonas poderão ser explicadas por algumas características estruturais destes compostos: a estrutura planar dos derivados xantónicos

possibilita a intercalação com o DNA, enquanto a introdução de diferentes grupos funcionais poderá permitir a obtenção de agentes antitumorais potencialmente úteis na terapêutica e que funcionam por mecanismos distintos (por exemplo, a introdução de grupos epóxido, que podem ser responsáveis pela presença de aductos covalentes com o DNA, ou os azóis associados a uma acção inibitória da aromatase (uma enzima importante na biossíntese dos estrogénios)) (3).

As estruturas xantónicas que apresentam actividade antitumoral incluem a molécula da xantona por si só, bem como outros derivados de origem natural e sintética. No primeiro grupo encontramos xantonas oxigenadas, glicosiladas, sulfonadas, preniladas e outros derivados como furanoxantonas, di-hidro-xantonas e piranoxantonas. No que diz respeito às xantonas de origem sintética o DMXAA (4-ácido acético-5,6-dimetilxantenona) (figura 5) e a prorspermina (figura 6) constituem dois bons exemplos de derivados xantónicos promissores com actividade antitumoral (3).

Assim, ao longo dos últimos anos diversos derivados xantónicos têm sido testados relativamente às suas características citotóxicas/tumorogénicas dos quais se destacam compostos como o DMXAA, psorospermina ou as xantonas preniladas (3).

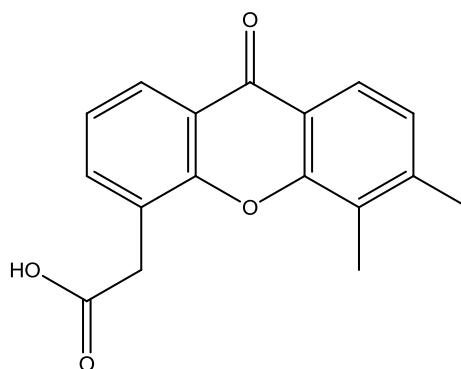


Figura 5- Estrutura do DMXAA.

O DMXAA constitui uma boa esperança para a obtenção de um novo medicamento antitumoral estando já numa fase adiantada do seu processo de desenvolvimento (ensaios clínicos de fase III). Este composto provoca um rápido colapso vascular e necrose tumoral por imunomodulação e indução das citoquinas, particularmente do TNF- α , interferão γ e da proteína 10 induzida pelo interferão γ (15).

O DMXAA poderá ser utilizado sinergisticamente não só com agentes citotóxicos convencionais e outros agentes antivasculares, mas também com agentes imunomoduladores que aumentam a resposta mediada pelo hospedeiro como citoquinas

1. Introdução e objectivos.

ou o óxido nítrico. Os estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos efectuados demonstram que este composto apresenta actividade antitumoral em doses bem toleradas (16).

A psorospermina é uma di-hidrofuranoxantona de origem natural isolada das raízes e cascas de uma planta africana tropical, a *Psorospermum febrifugum*. Este composto demonstrou actividade antileucémica quer *in vitro* quer *in vivo* (em ratinhos) e anticancerígena contra várias linha celulares tumorais humanas (ex. tumores da mama, cólon, leucemia-linfocítica ou leucemias resistentes a outros fármacos) (3, 17).

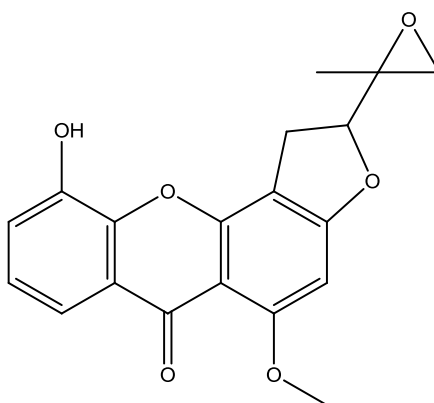


Figura 6- Estrutura da psorospermina.

A psorospermina actua por intercalação na molécula de DNA e alquilação do resíduo de guanina no local onde ocorre a clivagem pela acção da topoisomerase II (figura 7) (18). Ao colocar a estrutura tricíclica xantónica numa orientação paralela às pares de bases adjacentes, o composto interactua por ligações covalentes com a guanina intercalando-se entre os pares de bases nas posições 11 e 12 (19). A topoisomerase II é uma enzima essencial no processo de propagação celular mediando a clivagem e reunião da dupla cadeia de DNA e relaxando o enrolamento do DNA (20). Assim, a formação do complexo clivado pela topoisomerase II é bloqueada, o processo de quebra/reunião das cadeias de DNA é dificultado resultando no aparecimento de quebras da cadeia de DNA (18).

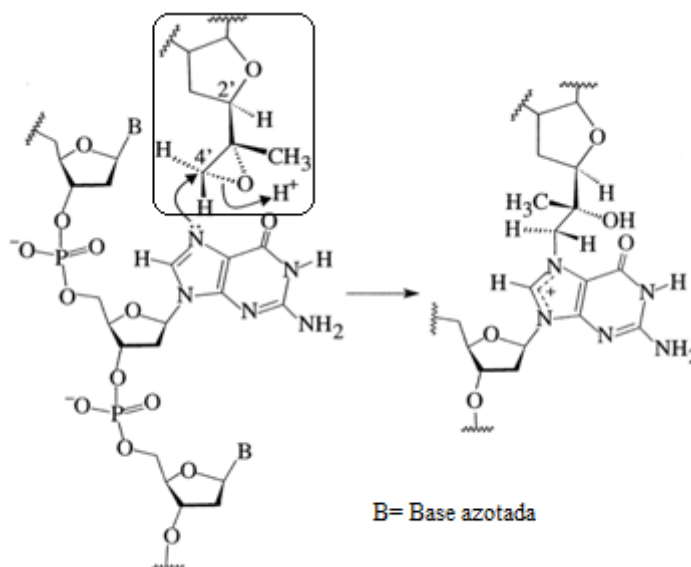


Figura 7- Mecanismo de intercalação da psorospermina (assinalada com um círculo) na cadeia de DNA. (adaptado de 21).

A mangiferina ou 1, 3, 6, 7- tetra-hidroxixantona- C2- β- D- glicosido é um polifenol frequentemente encontrado em plantas superiores e reconhecido pelas suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antivirais (3).

Estudos efectuados indicam que a mangiferina é responsável pela modulação da expressão de um número considerável de genes críticos à regulação da apoptose, replicação viral, tumorigénese, inflamação e de várias doenças, o que levou ao surgimento da interesse neste composto para o tratamento de doenças inflamatórias e/ou cancro (5). Outras propriedades destes compostos incluem a possibilidade de ser utilizado como agente preventivo em certos tipos de cancro (19), modulador de algumas respostas biológicas com efeitos antitumorais ou antivirais (22) e antiproliferativo em células leucémicas por indução de apoptose (23).

Os pericarpos do mangostão (*Garcinia mangostana L.*) (figura 8) foram utilizados durante muito tempo ao nível da medicina tradicional no tratamento de infecções da pele e feridas (3). Vários estudos demonstraram que contêm uma série de metabolitos secundários, nomeadamente xantonas oxigenadas e preniladas (24). Num estudo em que se testaram 6 xantonas isoladas do pericarpo do mangostão (α, β e γ-mangostin, mangostinona, garcinona E e o 2-isoprenil-1,7-di-hidroxi-3-metoxi xantona) na inibição do crescimento das linhas celulares leucémicas humanas HL60, demonstrou-se que todos

1. Introdução e objectivos.

os compostos apresentaram um efeito inibitório significativo, mostrando-se o α -mangostin (figura 8) a molécula mais activa (1).

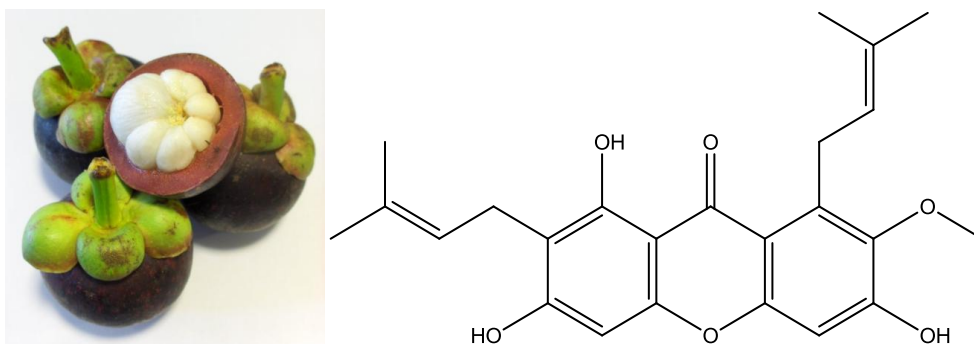


Figura 8 - O mangostão (adaptado de 25) e a estrutura do α -mangostin.

As xantonas preniladas, especialmente a garcinona E (figura 9), demonstram capacidade para inibir o crescimento de linhas celulares leucémicas (26). Este composto também demonstrou ser um potente citotóxico contra linhas celulares de carcinomas hepatocelulares gástricos e pulmonares (27). O extracto de *Garcinia mangostana* demonstrou efeitos anti-proliferativos em linhas celulares leucémicas (22) e cancro da mama (28), além de efeitos preventivos contra potenciais lesões preneoplásicas envolvidas na carcinogénese do cólon do rato (29), apresentando ainda propriedades apoptóticas e antioxidantes por inibição da produção de espécies reactivas de oxigénio intracelulares (28).

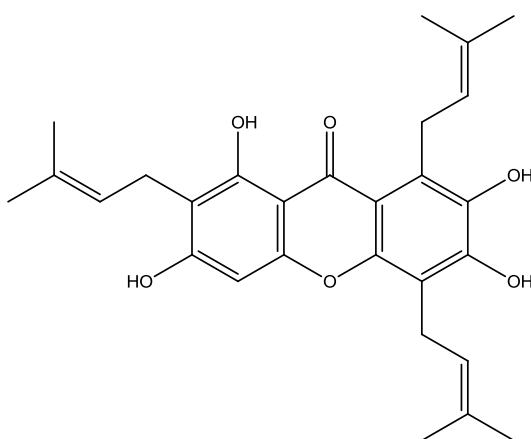


Figura 9- Estrutura da garcinona E.

Posto isto, verifica-se que algumas estruturas xantónicas poderão constituir uma base muito sólida para o desenvolvimento de potenciais agentes quimioterápicos. Para além disso, continuam a aparecer novos derivados xantónicos promissores para o tratamento das mais variadas doenças (3).

1.2- Actividade antitumoral das tioxantonas.

Nos últimos anos, as tioxantonas têm despertado interesse sobretudo devido às suas propriedades anti-cancerígenas (30). O núcleo tioxantónico (figura 10), também designado por dibenzo γ -tiopireno, constitui um derivado isostérico do núcleo xantónico apresentando um átomo de enxofre em substituição de um átomo de oxigénio (31).

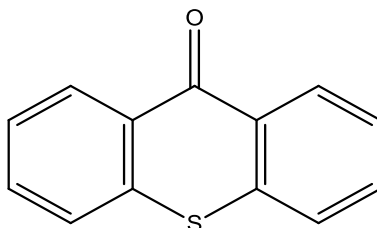


Figura 10- A estrutura base das tioxantonas.

1.2.1- Propriedades anti-cancerígenas da lucantona e hicantona.

A lucantona ou 1[2-(dimetilamino)etilamino]- 4 metil- 9H-tioxanten- 9-ona (figura 11), constituiu uma das primeiras tioxantonas a que foram associadas propriedades biológicas promissoras. Apresentava actividade contra dois dos parasitas responsáveis pela esquistossomose (*Schistosoma mansoni* e *Schistosoma heamatobium*) quando administrada por via oral a ratos, hamsters e primatas (32).

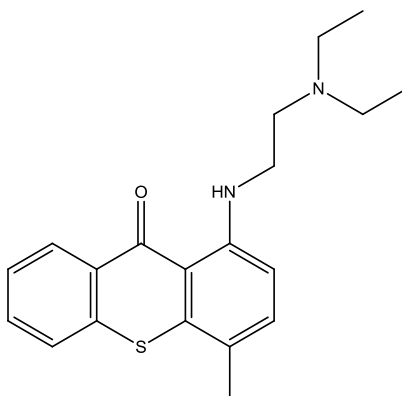


Figura 11- Estrutura da lucantona.

No entanto, a lucantona não era eficaz nem quando administrada por via injectável, nem em ensaios *in vitro*, o que levou à suspeita de que a substância activa seria um metabolito da lucantona (32). Posteriormente, determinou-se que esse metabolito seria um derivado 4-hidroximetílico, que recebeu a designação de hicantona (figura 12) (33).

1. Introdução e objectivos.

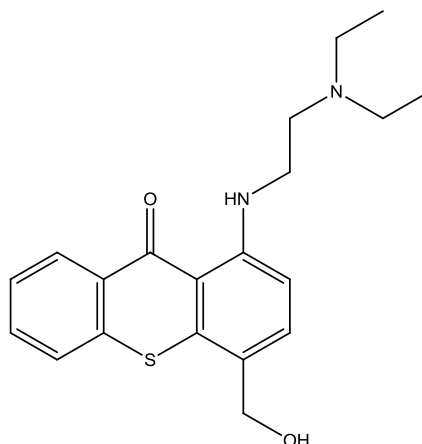


Figura 12- Estrutura da hicantona.

Em 1978, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, mais de 1 milhão de doentes foram tratados com hicantona (32). Porém, a experiência clínica acumulada desde aí levou ao surgimento de 3 pontos de suspeição acerca deste composto: toxicidade aguda (episódios de necrose hepática por vezes fatais), efeitos genéticos e carcinogénicos a longo prazo e desenvolvimento de resistência ao fármaco (34). Como resultado destas descobertas, juntamente com o aparecimento de novas alternativas terapêuticas (ex. praziquantel) a hicantona foi progressivamente menos utilizada no tratamento da esquistossomose humana (32).

A lucantona e a hicantona demonstraram também actividade antitumoral, sendo considerados agentes intercalantes do DNA (35, 36). A hicantona mostrou resultados promissores em algumas culturas celulares *in vitro*, nomeadamente em células de ratinho com linfoma (37) e em células embrionárias de rato infectadas com o vírus da leucemia de Rauscher (38).

Os efeitos bioquímicos da lucantona são bastantes semelhantes aos da actinomicina D, um antibiótico antineoplásico isolado de *Streptomyces parvulus* que actua por intercalação entre os pares de bases adjacentes citosina e guanina bloqueando a transcrição do DNA pela RNA polimerase (e, em consequência, a síntese proteica) (35, 39). No entanto, estudos demonstraram que, ao contrário da actinomicina D, os derivados tioxantónicos apresentam uma maior predisposição para se intercalarem no DNA ao nível dos pares de bases adjacentes adenina e timina (30). Além disso, o composto provoca ainda quebras no DNA, possivelmente por interacção com a topoisomerase II (39, 40, 41).

Sensivelmente na mesma altura em que a hicantona e a lucantona se começavam a perfilar como candidatos promissores na terapêutica anti-cancerígena, verificou-se que possuíam propriedades mutagénicas significativas (42). Estes compostos mostraram capacidade de se intercalarem entre as pares de bases do DNA, provocando a distorção da estrutura helicoidal e levando a um aumento na frequência de mutações (32). Estudos posteriores demonstraram ainda a existência de propriedades teratogénicas (43), além da capacidade de induzir aberrações cromossomais e mutações letais (44).

A administração deste compostos começou a ser associada ao aparecimento de mutações nomeadamente de mutações *frameshift* (42), isto é, mutações associadas à inserção ou eliminação de pares de bases de nucleótidos em números não múltiplos de 3, que podem levar a que o DNA não codifique para nenhuma proteína ou leve ao aparecimento de um cadeia polipeptídica com um número de aminoácidos menor que o previsto (45).

Mesmo assim, as propriedades intercalantes, por si só, não seriam suficientes para conferir mutagenicidade aos compostos pelo que deveria existir outro mecanismo que explicaria estas características (42). Os compostos associados ao aparecimentos de mutações *frameshift* têm uma acção preferencial no material genético em replicação, o que levou à conclusão que a hicantona e lucantona actuariam por outro mecanismo para além da simples intercalação no DNA. De facto, verificou-se que estes formavam um metabolito com propriedades alquilantes, o que explicaria as propriedades mutagénicas observadas (46).

Na terapêutica anticancerígena, algumas das actuais abordagens têm como alvo a integridade do DNA e, conseqüentemente, a sobrevivência celular. Estes agentes provocam lesões no DNA directa e/ou indirectamente provocando quebras no DNA (ex. radiação ionizante), formando ligações cruzadas (ex. mostardas nitrogenadas, nitrosureias, triazenos, antibióticos e compostos de platina) ou ligando-se a proteínas relacionadas com o DNA (ex. antimetabolitos e inibidores da topoisomerase) (47).

Mesmo assim, a eficácia destes agentes encontra-se limitada pela activação dos mecanismos de reparação do DNA, o qual constitui um dos principais responsáveis por fenómenos de resistência natural ou adquirida aos compostos que provocam lesões no genoma. Deste modo, desenvolver agentes que sejam capazes de originar perturbações nestes mecanismos constitui um desafio interessante porque permite aumentar a sensibilidade aos compostos anticancerígenos e ultrapassar os fenómenos de resistência tumoral, sendo que algumas destas estratégias passam pelo aproveitamento das propriedades da hicantona e lucantona (48, 49).

1. Introdução e objectivos.

A utilização de inibidores da topoisomerase II tem-se mostrado particularmente atractiva em tumores ao nível do sistema nervoso central pela diferenciação de comportamento entre as células cerebrais normais e as células cerebrais tumorais perante esta enzima. As células cerebrais normais não apresentam capacidade metabólica e por isso são pouco sensíveis à inibição da topoisomerase II, que é uma enzima essencial à replicação do DNA. As células cerebrais tumorais, uma vez que apresentam capacidade metabólica, são muito sensíveis à inibição desta enzima levando a uma toxicidade selectiva para estas (50).

A lucantona, pelas suas características de lipofilia e dimensão, tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. A sua utilização conjuntamente com a radiação ionizante permitiu acelerar a regressão de metástases no cérebro humano, tal como se verificou em ratos e ratinhos (39).

A acção sinérgica entre a lucantona e a radiação ionizante é observável através da formação de cortes na dupla cadeia de DNA devido à inibição da topoisomerase II pela lucantona, em conjunto com os danos provocados no DNA pela radiação ionizante e a inibição do mecanismo de reparação do DNA por excisão das bases devido à acção da lucantona (39, 51).

O mecanismo de reparação do DNA por excisão das bases (figura 13) pode ser resumido nos seguintes passos:

- Quando as bases do DNA são danificadas (por exemplo, pela radiação ionizante), estas são inicialmente removidas pelas enzimas celulares reparadoras das bases por excisão (glicosilases), o que leva ao surgimento de locais sem bases na cadeia de DNA.
- A remoção destes locais consiste no segundo passo deste processo executado pelas endonucleases que efectuam cortes na cadeia de DNA expondo os grupos 3'-OH essenciais para que ocorra síntese de DNA nestes locais.
- Os passos seguintes deste processo incluem a remoção dos grupos 5'-fosfato no local onde foram removidas as bases e o preenchimento destes locais com os nucleótidos adequados pela DNA polimerase β .
- No final a DNA ligase completa a reparação unindo os nucleótidos adicionados à cadeia de DNA (50).

MECANISMO DE REPARAÇÃO DE DNA POR EXCISÃO DAS BASES

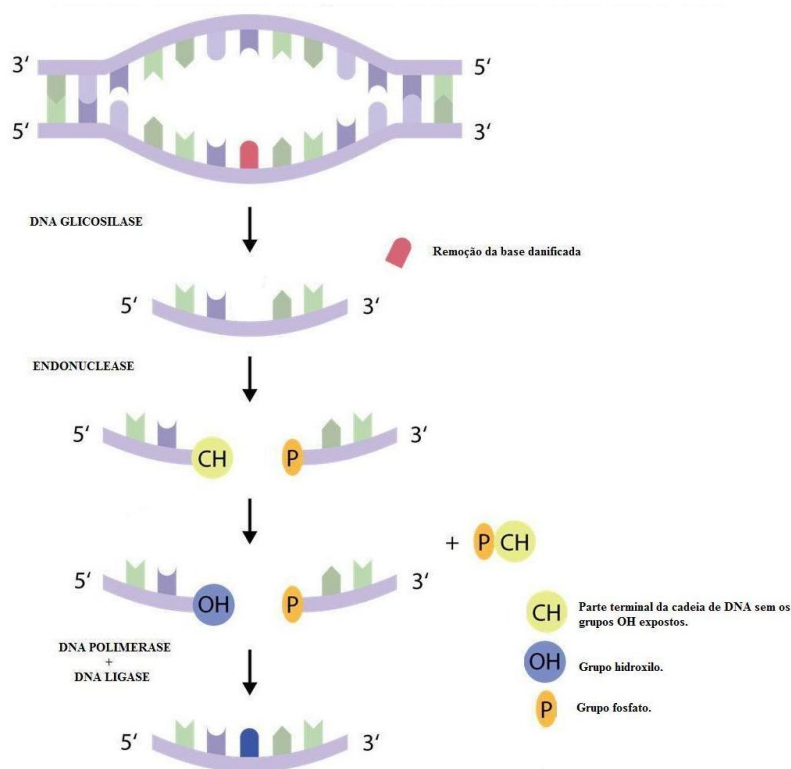


Figura 13- Mecanismo de reparação do DNA por excisão das bases (adaptado de 52).

Caso não ocorra a remoção dos locais sem bases na cadeia de DNA, estes poderão funcionar como inibidores endógenos da topoisomerase II (51). Por sua vez, a lucantona funciona com um inibidor exógeno da topoisomerase II levando ao aumento do número de cortes na dupla cadeia de DNA não só por acção directa na enzima mas também por interferência no processo de reparação do DNA por excisão das bases, nomeadamente no segundo passo descrito anteriormente (50). A lucantona mostrou-se capaz de inibir a endonuclease humana, fazendo com que os locais do DNA sem bases persistam e continuem a funcionar como inibidores da topoisomerase II endógenos, o que potencia e justifica o aumento do número de cortes na dupla cadeia de DNA por acção conjunta da lucantona e da radiação ionizante (53).

A metilguaninametiltransferase (MGMT) é uma enzima que tem a capacidade de remover os grupos O⁶-metilo formados por alquilação da guanina do DNA, podendo desempenhar um papel importante no desenvolvimento de resistências aos agentes anticancerígenos (54).

A ocorrência da alquilação da guanina com a formação do O⁶-metilguanida com propriedades promutagénicas constitui um dos possíveis mecanismos associados à

1. Introdução e objectivos.

ocorrência de episódios de carcinogenicidade em modelos humanos (55) e animais (56). Por outro lado, a acção desta enzima também funciona como um mecanismo de resistência à acção anti-cancerígena dos agentes alquilantes (54).

Enquanto as células que expressam elevados níveis de MGMT apresentam uma maior resistência à terapêutica anticancerígena, a neutralização da actividade desta enzima poderá tornar as células tumorais mais susceptíveis à acção dos agentes alquilantes do DNA (57).

No que respeita à hicanona, esta forma intermediária electrofílica com capacidade em alquilar macromoléculas celulares incluindo o DNA, RNA ou proteínas, o que potencia a formação da O⁶-metilguanida e minimiza a acção da MGMT (57).

1.2.2- Outras tioxantonas com propriedades anti-cancerígenas.

Ao longo dos anos foram aparecendo vários estudos envolvendo derivados tioxantónicos potencialmente promissores na terapêutica anticancerígena. Num desses estudos realizou-se a síntese de uma série de análogos tioxantónicos de um composto que já tinha previamente demonstrado actividade anti-cancerígena: a acronicina (figura 14) (58).

A acronicina é um alcalóide que apresenta citotoxicidade contra diversos tumores incluindo sarcomas, mielomas, carcinomas e melanomas (59, 60), embora a sua utilização na terapêutica anticancerígena não tenha tido os desenvolvimentos previstos (61). Porém, a acronicina serviu como modelo para a preparação de análogos tioxantónicos em que se preservou a semelhança estrutural, nomeadamente no que diz respeito ao sistema de anéis tricíclico e um quarto anel fundido de forma linear e angular (58).

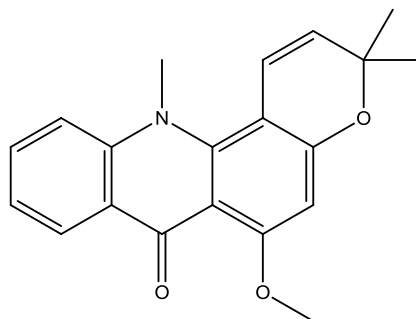


Figura 14- Estrutura da acronicina.

Deste modo, foram obtidos duas séries derivados tioxantônicos: os derivados do pirano [2,3-c]tioxanten-7-ona (figura 15) e os derivados do pirano [3,2-b]tioxanten-6-ona (figura 16) e avaliou-se a respectiva citotoxicidade dos compostos (58).

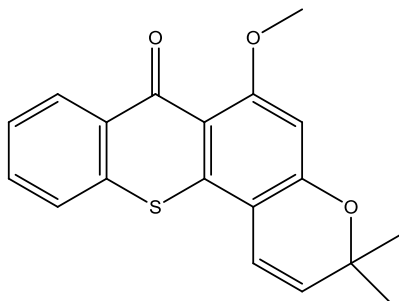


Figura 15- Estrutura do pirano [2,3-c]tioxanten-7-ona.

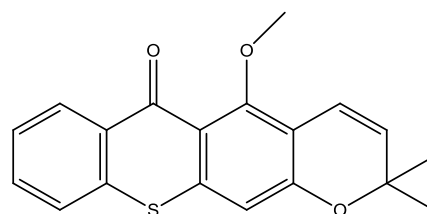


Figura 16-- Estrutura do pirano [3,2-b]tioxanten-6-ona.

A avaliação da citotoxicidade em linhas celulares leucémicas L1210, utilizando a acronicina como referência, mostrou que alguns destes derivados apresentavam uma citotoxicidade semelhante ou mesmo superior à acronicina (58).

Outros derivados tioxantônicos têm constituído uma via promissora para a obtenção de novos compostos com actividade anticancerígena, tendo alguns deles originando resultados encorajadores em ensaios pré-clínicos, quando testados em diversas linhas celulares tumorais (62). Alguns destes compostos, estruturalmente similares à hicanona, apresentam maior actividade antitumoral e menor toxicidade, o que tem sido em parte explicado pela substituição do oxigénio na posição 4 (CH₂OH na hicanona) por um átomo de azoto (CH₂N) (63).

Por exemplo, o SR233377 ou (N-[[1-[[2-dietilamino]etil]amino]-9-oxo-9H-tioxante-4-il]metil]-metanosulfonamida) (figura 17) apresenta actividade antitumoral e características farmacocinéticas muito promissoras. Tal como a lucantona e hicanona, o mecanismo de acção do SR233377 passa pela inibição da síntese de DNA por bloqueio da topoisomerase II (64).

1. Introdução e objectivos.

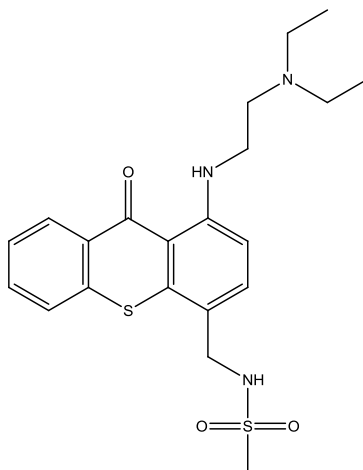


Figura 17- Estrutura do SR233377.

Nos ensaios pré-clínicos, o SR233377 mostrou actividade *in vitro* selectiva contra tumores sólidos de ratinhos (ex. contra o adenocarcinoma do cólon 38 (C-38), adenocarcinoma pancreático 03 (Panc 03) e adenocarcinoma mamário 16/C (Mam 16/C)). O mesmo composto mostrou também resultados animadores em ensaios *in vivo* com diversos tipos de tumores do cólon, pancreáticos e mamários em ratinhos (63).

Deste modo, o composto avançou para os ensaios clínicos onde começou a ser testado em humanos. No que diz respeito ao perfil de toxicidade observado não foram observados sinais de toxicidade significativa até às 335mg/m², porém a doses mais elevadas começaram a surgir sinais de arritmias ventriculares com prolongamento do intervalo Q-T (*torsade de pointes*). Como consequência dos episódios de cardiotoxicidade observados, o desenvolvimento deste composto foi interrompido (64).

A causa do prolongamento do intervalo Q-T poderá estar associada ao grupo SO₂CH₃ na posição 4 da molécula pelo que têm sido testados outros análogos que não contenham o referido grupo sendo um desses análogos o SR271425 (figura 18) (62).

O SR271425 ou (N-[[1-[[2-dietilamino]etil]amino]-7-metoxi-9-oxo-9H-tioxante-4-il]metil]-formamida) é uma tioxantona de 3^a geração e análogo da hicanona que apresenta um vasto espectro de actividade quer *in vivo* quer *in vitro* em modelos tumorais de roedores e humanos (65).

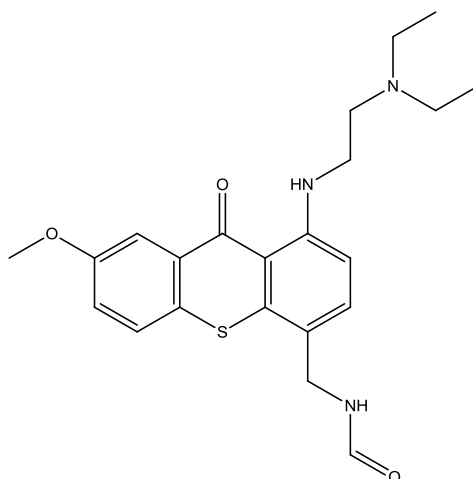


Figura 18- Estrutura do SR271425.

O SR271425 foi avaliado contra diversos tipos de tumores em ratinhos tais como leucemias, tumores no cólon, pancreáticos ou mamários. Mostrou resultados prometedores contra a maioria dos tumores testados e foi bem tolerado quer quando administrado por via oral, quer quando administrado por via intravenosa. Historicamente, quanto mais tumores responderem ao composto em estudo e em mais que uma dose não tóxica, maior a probabilidade de este apresentar sucesso nas fases posteriores do processo de desenvolvimento, facto que alimentou as esperanças associadas a este composto (62).

Nos primeiros ensaios *in vitro* efectuados com o SR271425, as linhas celulares de cancro do cólon e do pulmão mostraram-se as mais sensíveis ao composto. Por sua vez, linhas celulares de melanomas ou de cancros do sistema nervoso central mostraram maior resistência à acção antitumoral do composto (66).

Nos ensaios *in vivo* o SR271425 demonstrou um grande espectro de actividade e um elevado grau de eficácia, incluindo mesmo casos de regressão tumoral completa e cura, mesmo quando os tumores eram parcial ou completamente refractários aos agentes antitumorais clássicos (ex. taxol, doxorubicina) (62).

Relativamente ao mecanismo de acção, o SR271425 parece ligar-se ao DNA mas, contrariamente a agentes citotóxicos estruturalmente similares, não inibe a topoisomerase I ou II (67). O SR271425 tem a capacidade de inibir a helicase mas o respectivo IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da actividade celular) mostrou-se demasiado elevado para explicar a citotoxicidade do composto (68). Sendo assim, o mecanismo de acção deste composto não se encontra ainda bem esclarecido (65).

1. Introdução e objectivos.

O SR271425 atingiu a fase I dos ensaios clínicos. A maioria dos efeitos adversos notificados não estava relacionada com a dose, com excepção de episódios de descoloração da pele e de prolongamento do intervalo Q-T registados para doses acima dos 532 mg/m². A sucessão de situações de prolongamento do intervalo Q-T, com a consequente possibilidade de desenvolvimento de episódios de *torsade de pointes* ou de outras arritmias, levou a que o desenvolvimento deste fármaco tenha sido também interrompido (65).

Noutro estudo avaliou-se a capacidade de inibição da formação de colónias de células tumorais humanas por parte de 3 compostos: o SR233377, o SW68210 e o SW71425 (figura 19). Os tipos de tumores testados incluíram cancro da bexiga, cérebro, mama, cólon, vesicular biliar, cabeça e pescoço, ovários, pâncreas, melanomas, mesoteliomas, sarcomas e tumores primários de origem desconhecida (66).

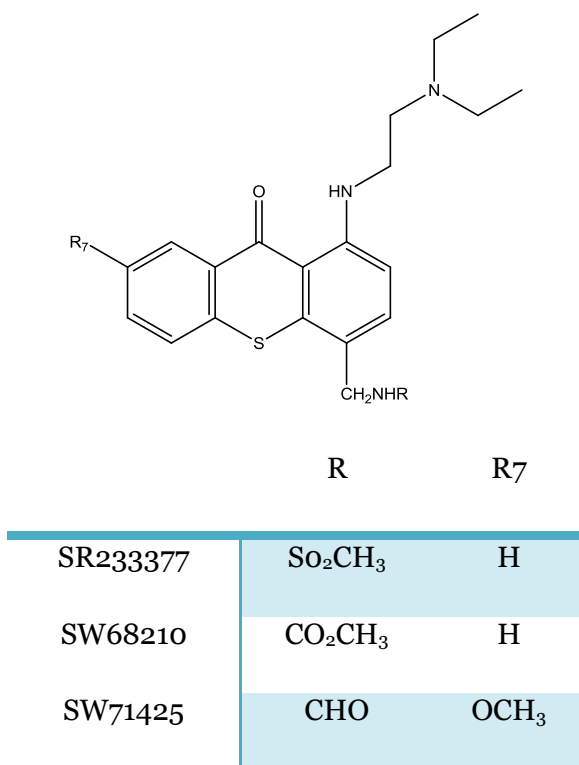


Figura 19- Estruturas do SR233374, SW68210 e SW71425.

Embora o SR233377 não tenha proporcionado resultados promissores, os outros 2 análogos testados mostraram propriedades antitumorais contra diversos tipos de tumores semelhantes pelo que poderão constituir bons candidatos a entrarem em ensaios clínicos (66).

1.3- O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos envolve investimentos muito avultados, parte dos quais são dedicados à síntese e ao estudo de milhares de compostos que acabam por não atingir o mercado: em média a cada 5000 a 10000 compostos que mostram actividade sobre determinado alvo terapêutico apenas 1 atinge o mercado (figura 20) (69).

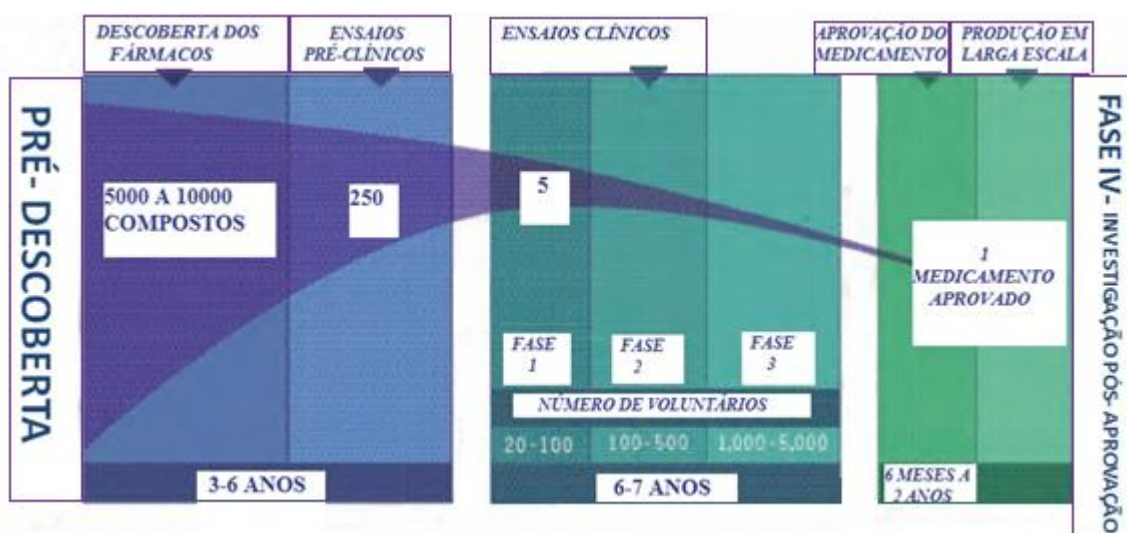


Figura 20- Esquema resumido do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (adaptado de 69).

De um modo geral os investigadores deverão:

- Identificar um alvo terapêutico e validá-lo.
- Descobrir a molécula adequada (composto-líder) para interagir com o alvo escolhido.
- Preparar análogos estruturais que permitam elucidar a relação estrutura-actividade e proporcionem a melhor farmacocinética e farmacodinâmica.
- Testar os novos compostos a nível laboratorial e clínico de modo a avaliar a sua segurança e eficácia.
- Seleccionar de entre os potenciais candidatos, aquele que apresente um índice terapêutico mais elevado.
- Garantir a aprovação do fármaco e fazer com que este passe a estar disponível no mercado (69).

1. Introdução e objectivos.

1.3.1- O processo de descoberta e planeamento de novos fármacos.

O processo actual de descoberta e planeamento de novos fármacos inicia-se com a escolha da doença sobre a qual se pretende actuar, seguindo-se a identificação e validação dos alvos terapêuticos relevantes no processo dessa doença e selecção e optimização do composto-líder. Todos estes procedimentos são acompanhados de ensaios biológicos que permitem avaliar a eficiência do processo, assegurar a farmacodinâmica e farmacocinética adequadas e garantir a selectividade e segurança do futuro fármaco (69).

Pré-descoberta: o conhecimento da doença.

Antes de ser possível a descoberta de um potencial novo fármaco, os investigadores dedicam-se à compreensão mais aprofundada possível da doença que pretendem tratar. Tentam compreender como os genes são alterados, como isso afecta as proteínas que eles codificam e como as proteínas interagem umas com as outras nas células, como essas células alteradas afectam os tecidos onde se encontram e finalmente como a doença afecta o paciente. Esta investigação pode prolongar-se por anos, muitas vezes revela-se infrutífera e, mesmo que se atinja o sucesso, serão necessários ainda mais anos de investigação de modo a transformar o conhecimento básico do que provoca a doença num novo tratamento (69).

Identificação do alvo terapêutico.

Após a equipa de investigação ter compreendido as causas e o processo como se desenvolve determinada doença, segue-se a selecção de um alvo para um potencial novo fármaco. O alvo terapêutico corresponde a uma única macromolécula, frequentemente um gene ou proteína que interfira de forma directa e decisiva numa doença particular. Mesmo nesta fase inicial do processo de descoberta é fundamental a escolha de um alvo que potencialmente possa ser activado e interactue com a molécula do fármaco a testar (70). Uma selecção inadequada do alvo terapêutico condenará o sucesso do processo de descoberta e desenvolvimento dos futuros candidatos a fármacos. É assim fundamental que este seja validado de forma a garantir a sua utilização no tratamento de uma doença (71).

Validação do alvo terapêutico.

Nesta fase os investigadores devem mostrar que o alvo terapêutico seleccionado está envolvido na doença em causa e pode ser activado pelo fármaco (69). As interacções com o alvo respectivo devem estar comprovadamente associadas com a alteração pretendida no processo da doença. Por outro lado, é fundamental que a interacção com o alvo seja selectiva de modo a diminuir os efeitos indesejáveis e impedir outras alterações fisiológicas originadas por interacções com outros alvos no organismo (70).

Para alcançar este objectivo podem ser utilizadas diversas abordagens, tais como:

- Modelos computacionais de rastreio da interacção entre os alvos proteicos e os potenciais fármacos (72).
- Modelos *in vivo*- utilização de modelos animais específicos para a doença em estudo. Uma das metodologias mais utilizadas para este fim baseia-se na utilização de ratinhos *knockout* em que determinados genes são alterados ou eliminados de modo a modificar a expressão do genoma. O silenciamento de determinados genes associados ao alvo terapêutico em estudo poderá constituir uma boa abordagem para sua validação, assumindo que este procedimento terá um efeito semelhante à administração *in vivo* de um inibidor específico deste alvo (72).
- Genómica- o estudo da expressão genética associada ao alvo terapêutico de modo a clarificar o papel fisiológico deste. Ao nível da genómica merece particular destaque o uso de genes *knockout*, da tecnologia *antisense* (utilização de pequenas sequências de oligonucleótidos que se ligam a determinado RNA mensageiro (mRNA) codificado pelos genes em estudo levando à sua inactivação) e de RNA de interferência (RNAi) (dupla cadeia de RNA específica para os genes em estudo e que permite o silenciamento da expressão proteica a nível pós-transcricional) (72).
- Proteómica- o estudo e a manipulação das proteínas presentes em determinada célula. Uma abordagem para a validação do alvo terapêutico poderá passar pela modulação da actividade de um alvo proteico específico (72).

1. Introdução e objectivos.

Descoberta do fármaco: encontrar uma molécula promissora (composto-líder) que se possa tornar no fármaco.

O principal objectivo desta etapa consiste na procura do “composto-líder” que actuando no alvo terapêutico possa alterar o curso da doença. O fio condutor da descoberta de fármacos sempre assentou neste pressuposto: encontrar um composto dotado da actividade biológica pretendida, mesmo não possuindo a potência ou as características farmacocinéticas desejáveis. Este composto, denominado por composto-líder, serve como ponto de partida para a criação de novas moléculas mais eficazes e de outras que ajudem a compreender a relação estrutura-actividade. É a partir deste composto-líder que se vai criar o novo fármaco (69).

O composto-líder poderá ter várias origens tais como:

- Fontes naturais – plantas, animais, produtos marinhos, microorganismos (69).
- Síntese *de novo* – refere-se à síntese de moléculas mais complexas partindo de estruturas simples como açúcares ou aminoácidos (69).
- Rastreo massivo de compostos (HTS- *High Throughput Screening*) (figura 21) - a forma mais comum de encontrar um composto-líder para a indústria farmacêutica. O HTS é uma metodologia em que um grande número de compostos é avaliado relativamente à sua actividade biológica e à sua afinidade para determinados alvos moleculares. O HTS recorre a procedimentos robotizados e computadorizados de modo a fazer um rastreo simultâneo de um elevado número de compostos. Os compostos com resultados mais promissores são designados por *hits*, cujo posterior aperfeiçoamento poderá levar ao surgimento dos compostos-líder (73).



Figura 21- Um sistema de HTS (adaptado de 74).

Optimização do composto-líder.

A optimização de moléculas que mostraram actividade promissora na fase de descoberta e avaliação é fundamental para chegar a um potencial candidato a fármaco eficaz, com boas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas. Irá ser a partir do balanço entre a potência no alvo terapêutico, selectividade, características de absorção, distribuição, metabolização, eliminação e propriedades de segurança (pré)-clínica que se vai realizar a selecção e desenvolvimento clínico de um potencial novo fármaco (75).

Depois de seleccionado um composto líder, é habitual a síntese de um número frequentemente elevado de análogos que vão permitir conhecer, perceber e melhorar o comportamento farmacodinâmico, farmacocinético e toxicológico das substâncias em estudo. A obtenção de análogos permite a realização de estudos de relação estrutura-actividade. Para estes estudos podem ser utilizadas várias metodologias como a cristalografia de raios-X, a ressonância magnética nuclear (RMN), a modelização molecular e a avaliação de ensaios biológicos que permitem racionalizar as particularidades estruturais das moléculas com as actividades observadas (76).

Após os estudos de relação estrutura-actividade estarem efectuados, o passo seguinte consiste na identificação do farmacóforo, que se baseia na determinação dos grupos funcionais que são relevantes para a actividade biológica em questão. Em seguida efectua-se a síntese de análogos com as modificações estruturais necessárias de modo a permitir a obtenção de um composto com elevada actividade, selectividade para o alvo terapêutico e baixa toxicidade (76).

Porém, o composto que apresente as melhores interacções com o alvo terapêutico não é necessariamente o candidato mais promissor a prosseguir para os ensaios pré-clínicos e clínicos. De modo a atingir um alvo terapêutico particular, um composto terá de ultrapassar diversas barreiras no organismo, pelo que este para além possuir potência relevante terá de apresentar ainda as características farmacocinéticas e de toxicidade adequadas (77).

O potencial para a ocorrência de reacções adversas poderá ser minimizado através de modificações estruturais adequadas no composto candidato numa fase precoce do processo de desenvolvimento. Deste modo, explica-se o aumento do interesse acerca da análise estrutural para a previsão da toxicidade cuja finalidade é a identificação das características estruturais que conferem propriedades tóxicas aos compostos (toxicóforo).

1. Introdução e objectivos.

Assim, será possível introduzir alterações moleculares de modo a melhorar as características metabólicas e de toxicidade das moléculas, mantendo os efeitos terapêuticos desejados (78).

Alguns grupos funcionais presentes nas moléculas dos fármacos são responsáveis pela formação de metabolitos que estão envolvidos em situações de toxicidade para o Homem. Como exemplos podemos ter os ácidos arilpropiónicos e arilacéticos, óximas, anilinas, anilidas, hidrazinas, hidrazidas, hidantoinas, quinonas, metilquinonas, anéis nitroaromáticos, anéis heteroaromáticos, hidrocarbonetos halogenados alifáticos e alguns aromáticos e grupos funcionais que possam ser oxidados a acroleínas e ácidos gordos de cadeia média. Assim, uma molécula candidata que apresente na sua estrutura (ou adquira por metabolização) estes grupos funcionais apresentará riscos mais elevados de insucesso ao longo do seu desenvolvimento (78).

Uma estratégia para melhorar o rastreio destes compostos potencialmente tóxicos passa pelo uso de abordagens *in silico* (computacionais) em etapas mais precoces do processo de descoberta de novos fármacos funcionando como uma aproximação para eliminar efeitos tóxicos em humanos mesmo antes de o composto estar fisicamente disponível (75, 78).

Os métodos computacionais têm a capacidade de rapidamente gerarem e armazenarem centenas de estruturas de interesse. A utilização desta abordagem pode funcionar como uma pesquisa de “alertas estruturais” relativamente ao composto em análise, nomeadamente acerca da possibilidade de este originar intermediários potencialmente tóxicos. Estas características melhoram a escolha das estruturas mais promissoras na fase inicial do processo de descoberta e facilita a identificação do toxicóforo. Mesmo assim, os métodos *in silico* não têm a capacidade de substituir completamente os testes de toxicidade convencionais embora poderão ser úteis como primeiro passo para a eliminação de compostos com potenciais efeitos tóxicos (75,78).

Posto isto, a estratégia actual baseia-se na optimização simultânea de todas as propriedades que possam condicionar o sucesso de um potencial novo fármaco nas fases mais avançadas do seu desenvolvimento: optimização multidimensional. Assim, as alterações moleculares efectuadas procuram melhorar propriedades como a potência, selectividade e também as características farmacocinéticas dos compostos em estudo (79).

No presente trabalho procedeu-se à modificação molecular de uma tioxantona aminada 1 (TXA1), que mostrou possuir propriedades antitumorais significativas no

sentido de melhorar as suas propriedades biológicas e farmacocinéticas. A estratégia adoptada consistiu na introdução de uma cadeia alquílica aminada.

Um número considerável dos fármacos que fazem parte do actual arsenal terapêutico que dispomos são aminas (figura 22). A presença da cadeia amina alquilada permite criar novas interacções com o alvo terapêutico, nomeadamente pela formação de novas pontes de hidrogénio e interacções hidrofóbicas (cadeia carbonada). Para além disso, a introdução de um grupo amina pode alterar as propriedades farmacocinéticas de uma molécula uma vez que lhe confere basicidade e aumenta a sua polaridade (80).

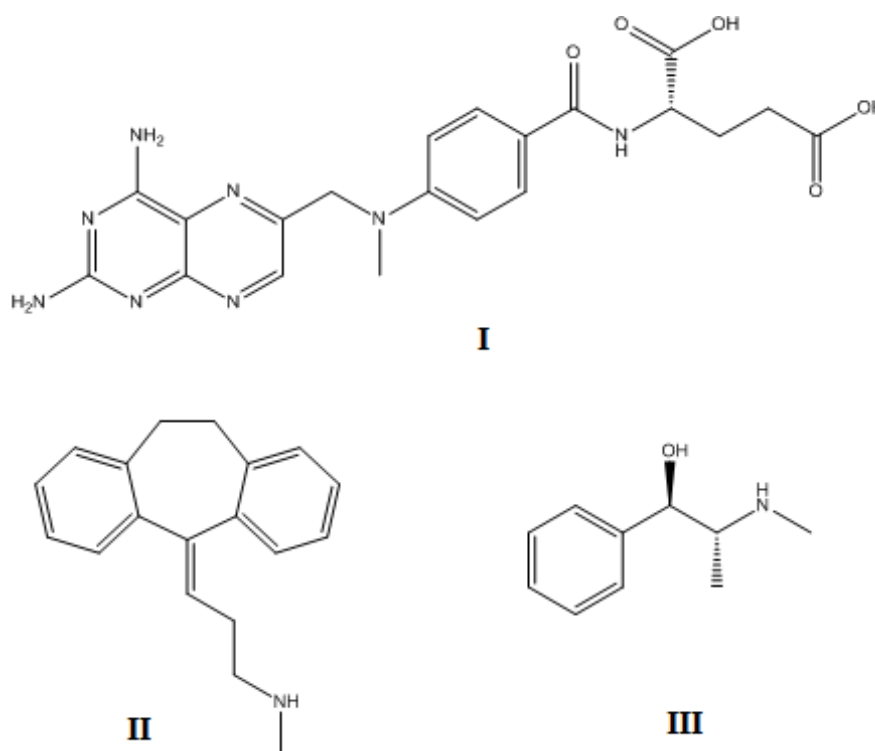


Figura 22- Exemplos de fármacos que apresentam uma cadeia aminica: I-Metotrexato (acção antitumoral) ; II- Nortriplítina (acção antidepressiva) ; III- Pseudoefedrina (acção anti-histamínica).

1.3.2- O processo de desenvolvimento de novos fármacos.

No processo de desenvolvimento de novos fármacos, os compostos candidatos deverão ser testados com o objectivo de assegurar não só que são seguros e eficazes mas que podem ser administrados de modo adequado. Para tal, realizam-se ensaios pré-clínicos e clínicos que avaliam aspectos de toxicidade, metabolismo, farmacológicos, de estabilidade e de formulação dos compostos em estudo (69).

1. Introdução e objectivos.

Ensaio pré-clínicos.

Nos ensaios pré-clínicos as novas entidades químicas são testadas *in vitro* e *in vivo* (modelos animais) de modo a determinar quais destas vão prosseguir para testes em humanos. Nesta fase procura-se perceber como os compostos candidatos funcionam e quais os seus perfis de segurança (69).

Os ensaios pré-clínicos englobam uma série de etapas:

- Ensaio *in vitro*- em culturas celulares ou ensaios de afinidade para os alvos terapêuticos moleculares, de modo a confirmar a actividade dos compostos em estudo (81).
- Ensaio *in vivo*- utilizando os modelos animais adequados de modo a confirmar a actividade *in vivo* (81).
- Estudos farmacocinéticos- que permitem avaliar os parâmetros de absorção, distribuição, metabolização e eliminação (81).
- Estudos de toxicidade- que permitem definir a dose de segurança para os primeiros estudos em humanos (81).

Ensaio clínicos.

Os ensaios clínicos correspondem aos primeiros ensaios efectuados em humanos. O reduzido número de compostos que atingem esta fase são os que mostraram as características mais promissoras ao longo das etapas anteriores, nomeadamente ao nível dos resultados nos modelos animais, características farmacocinéticas e metabólicas adequadas, tempo de semi-vida apropriado e ausência de efeitos adversos significativos (80).

Estes ensaios prolongam-se por vários anos e dividem-se em 4 fases, cujas características básicas (nomeadamente os objectivos e a amostra populacional utilizada) estão representadas na tabela 1.

Tabela 1- Características gerais de todas as fases dos ensaios clínicos (adaptado de 79).

Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
<ul style="list-style-type: none">• Avaliar a segurança do composto, identificar as reacções adversas e determinar a dose de segurança deste• 20 a 100 voluntários saudáveis.	<ul style="list-style-type: none">• Avaliar os efeitos terapêuticos do composto e efeitos adversos a curto prazo. Analisar a dose óptima e a posologia a ser utilizada.• 100 a 500 pacientes.	<ul style="list-style-type: none">• Avaliar os efeitos terapêuticos e os efeitos adversos (relação benefício-risco). Recolha de informação que permita uma utilização segura do composto.• 1000 a 5000 pacientes.	<ul style="list-style-type: none">• Farmacovigilância após entrada do medicamento no mercado.• Todos os utilizadores do medicamento.

Deste modo, para que se consiga atingir o sucesso são necessários diversos recursos: os melhores cientistas, tecnologia altamente sofisticada e os métodos mais elaborados juntamente com muita persistência e até sorte. Apesar de tudo, o processo de descoberta de novos fármacos continua a ser uma aposta meritória e compensadora, pois, frequentemente, só assim é possível fornecer uma nova esperança a milhões de pacientes (69).

1. Introdução e objectivos.

1.4-A importância da avaliação da toxicidade no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.

As propriedades farmacocinéticas e de toxicidade de um candidato a fármaco estão entre as principais razões que obrigam a interromper o seu desenvolvimento clínico. De modo a tentar minimizar o impacto deste problema, a indústria farmacêutica efectua uma avaliação mais abrangente de novas moléculas fazendo incluir ainda nas fases de planeamento e optimização testes de avaliação da ADME (absorção, distribuição, metabolização e eliminação) e de toxicidade. Esta abordagem tem como objectivo avaliar o mais cedo possível os potenciais efeitos indesejáveis das novas moléculas e através da informação obtida, avaliar a relação benefício-risco e determinar se as moléculas prosseguem ou não para a fase de desenvolvimento (82).

1.4.1- A avaliação toxicológica ao longo das etapas de descoberta e optimização de um composto líder.

As características toxicológicas passaram a constituir um dos aspectos mais limitantes na passagem de compostos candidatos da fase de descoberta para a fase de desenvolvimento (83). Assim, a capacidade de obtenção de informações sobre o potencial de toxicidade dos compostos candidatos o mais cedo possível tornou-se cada vez mais importante como base do julgamento de quais destes progrediriam com sucesso para a fase de desenvolvimento (78).

De modo a alcançar este objectivo, várias abordagens foram desenvolvidas. Estas incluem metodologias *in silico* ou computacionais, uma série de ensaios *in vitro* e alguns ensaios *in vivo* (84).

Os diversos ensaios na fase de descoberta de novos fármacos incluem a avaliação das áreas associadas às principais causas de insucesso da evolução dos compostos-líder a fármacos tais como as propriedades físicas e farmacêuticas do potencial novo fármaco, as suas características metabólicas e farmacocinéticas e vários parâmetros associados à sua segurança tais como a avaliação da segurança farmacológica, aspectos toxicológicos gerais e genotoxicidade (84).

Avaliação da segurança farmacológica.

Estes estudos consistem num despiste dos principais órgãos-alvo de toxicidade de modo a perceber aqueles que podem desempenhar um papel relevante para a segurança

em humanos. Na maioria dos casos, o foco destes estudos situa-se ao nível da função dos sistemas cardiovascular, nervoso e hepático embora outros sistemas possam ser avaliados de acordo com as características das moléculas candidatas (85).

Rastreio da genotoxicidade.

A genotoxicidade é um parâmetro crucial e limitante da utilização de qualquer candidato a fármaco. Assim, é fundamental conhecer e avaliar o potencial genotóxico das moléculas em estudo o mais cedo possível. Um rastreio dos compostos-líder em relação à genotoxicidade é fundamental pois permite excluir precocemente os compostos e metabolitos que iriam demonstrar genotoxicidade somente em ensaios posteriores (82).

Uma das primeiras etapas para testar o potencial de genotoxicidade consiste em detectar eventuais alertas de toxicidade genética, através da presença de particularidades estruturais na estrutura química dos compostos. Neste aspecto uma abordagem *in silico*, a experiência prévia com estruturas particulares e até as vias metabólicas funcionam como fontes de informação importantes para o investigador. Actualmente, estão disponíveis comercialmente sistemas para avaliação da genotoxicidade que possibilitam o rastreio de um elevado número de compostos numa fase inicial do processo de descoberta (ex. Vitotox ®) (86).

Numa fase mais avançada de optimização do composto líder, ensaios como o ensaio do micronúcleo *in vitro* em cultura V79 de células de hamster chinês proporcionam uma boa indicação de possível genotoxicidade (87).

Análise da toxicocinética.

A toxicocinética constitui uma aplicação da farmacocinética de modo a determinar a relação entre a exposição de um composto no organismo e a sua toxicidade. As características de ADMET (absorção, distribuição, metabolização, eliminação e toxicidade) pouco favoráveis das novas moléculas candidatas a fármacos podem constituir motivos relevantes que levam ao abandono do projecto do seu desenvolvimento. Para isso é habitual a execução de um rastreio rápido da farmacocinética, utilizando um reduzido número de animais (normalmente roedores) e que permite avaliar esse risco (88).

1. Introdução e objectivos.

Avaliação dos efeitos terapêuticos e não terapêuticos.

Os efeitos terapêuticos de um composto correspondem à evidência da actividade farmacológica pretendida, a qual resulta da interacção da molécula activa com o alvo terapêutico a que se destina (receptor, enzimas...). Por sua vez, os efeitos não terapêuticos referem-se a todos os outros que resultam da afinidade para outros alvos e cuja consequente activação, bloqueio ou modulação provoca um efeito funcional. Muitas das vezes, a actividade não terapêutica pode ser sub-clínica e não apresentar relevância, mas em outras situações pode estar associada a efeitos adversos da substância activa que podem ir desde um ligeiro incómodo a estados mais severos detectados quer nos estudos pré-clínicos quer nos ensaios clínicos (82).

No programa de descoberta de novos fármacos a abordagem habitual passa pela demonstração da afinidade/actividade de determinada molécula para proteínas similares ou relacionadas, de modo a compreender a selectividade dessa molécula para o alvo pretendido. Aí, a abordagem química consiste sobretudo em identificar características estruturais específicas dentro do alvo proteico, de modo a permitir o desenvolvimento de moléculas capazes de apresentarem actividade selectiva na enzima-alvo comparativamente às enzimas relacionadas (82).

Rastreio da segurança dos candidatos a fármacos.

O objectivo do rastreio da segurança dos candidatos a fármacos é proporcionar informação que permita confirmar, do ponto de vista toxicológico, a selecção do candidato mais forte e potencialmente mais seguro para entrar na fase de desenvolvimento. Este género de estudos utiliza modelos animais (roedores e não roedores) para avaliação de alguns efeitos *antemortem*, características de anatomia patológica ou patologia clínica em doses que superam os níveis tóxicos (82).

Pese embora estes ensaios tenham como objectivo minimizar o risco de insucesso na fase de desenvolvimento, será importante reconhecer que o curto período em que estes ensaios são conduzidos (aproximadamente duas semanas) não consegue excluir completamente todos os episódios de toxicidade, nomeadamente aqueles que aparecem apenas após longos períodos de exposição à substância em análise (82).

Embora possa parecer algo frustrante quando a passagem de um composto candidato para a fase de desenvolvimento é cancelada, o facto de esta decisão ser tomada numa fase inicial do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos constitui uma vantagem para a indústria farmacêutica. Ao efectuar esta decisão numa fase

mais precoce, a indústria farmacêutica pode conseguir poupar vários recursos que seriam necessários para as fases seguintes pois os efeitos tóxicos observados nos ensaios em 14 dias seriam ainda mais exacerbados nos estudos crónicos posteriores (*fail soon fail cheaper*) (82).

1.4.2- A avaliação toxicológica na fase pré-clínica do desenvolvimento.

Os novos candidatos a fármacos ao entrar na fase pré-clínica de desenvolvimento são testados relativamente à sua toxicidade em animais. A dose necessária para produzir a toxicidade (ou LD₅₀: dose letal para 50% da população) é comparada com a dose necessária para atingir a eficácia terapêutica (ED₅₀: dose eficaz mínima para 50% da população) definindo-se esta razão como índice terapêutico, o qual constitui uma medida numérica dos efeitos benéficos e da segurança relativa dos fármacos. O objectivo do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos passa pela selecção de moléculas com um índice terapêutico o mais elevado possível ou seja, um composto que apresente uma dose letal elevada (maior segurança) e uma dose eficaz baixa (maior eficácia) (83).

A avaliação da toxicidade no desenvolvimento pré-clínico tem como objectivo primordial a caracterização das situações de toxicidade associadas aos órgãos-alvo, a sua relação com a dose, exposição e potencial reversibilidade. A informação obtida nesta fase é fundamental para a determinação das doses a serem utilizadas nos ensaios clínicos em humanos e para a identificação dos parâmetros relacionados com efeitos adversos a serem monitorizados clinicamente. Embora limitados, os ensaios efectuados no início do processo de desenvolvimento deverão ser adequados de modo a evidenciar potenciais efeitos tóxicos que irão ocorrer nos ensaios clínicos (89, 90).

Há uma série de ensaios base desenvolvida pela ICH (Conferência Internacional de Harmonização) que pretendeu criar um esquema para permitir a avaliação dos compostos, visando a padronização de ensaios, métodos e protocolos para os ensaios base e de acordo com as boas práticas de laboratório (91, 92).

A série de ensaios base recomendada para a avaliação da toxicidade dos compostos na fase pré-clínica inclui:

- Ensaios de toxicidade aguda.
- Ensaios de toxicidade por dose múltipla.
- Avaliação da toxicocinética.
- Ensaios de toxicidade na função reprodutora.
- Ensaios de genotoxicidade.

1. Introdução e objectivos.

- Ensaios de carcinogenicidade
- Estudos de tolerância local, de irritação da pele e de fotossensibilidade.
- Ensaios de imunotoxicidade.
- Avaliação da segurança farmacológica (90).

Além destes há ainda toda uma série de ensaios pontuais e que não fazem parte desta série mas que são usados para dar suporte aos ensaios base, de acordo com as características dos compostos e dos resultados obtidos nos primeiros ensaios (91).

Ensaio de toxicidade aguda.

Os ensaios de toxicidade aguda medem os efeitos adversos que ocorrem menos de 14 dias após a administração de uma única dose ou de múltiplas doses em menos de 24 horas do composto em estudo. Os ensaios são efectuados sobretudo em roedores e os resultados obtidos podem permitir identificar o mecanismo de acção tóxica da substância, fornecer indicações acerca das doses associadas à toxicidade nos órgãos-alvo e determinar as doses a serem usadas nos estudos de toxicidade por dose múltipla. Através destes ensaios é ainda possível comparar a toxicidade e a relação dose-resposta de membros de uma mesma família química, de modo a determinar qual o melhor candidato de uma série a permanecer no estudo (93).

A tendência actual passa pela utilização de alguns métodos que não se baseiam na determinação do LD₅₀ (que correspondia à abordagem clássica), como o método “*up and down*”) no qual se administram doses sequenciais a apenas um animal em cada passo e em que a dose a utilizar irá depender do facto de o animal ter sobrevivido ou não no ensaio anterior. Este teste permite estimar a letalidade e o intervalo de confiança das doses associadas a cada um dos compostos em estudo (94).

Ensaio de toxicidade por dose múltipla.

Nos ensaios de toxicidade por dose múltipla efectua-se a avaliação da toxicidade causada pela administração repetida de uma determinada dose ao longo do tempo. Tradicionalmente, esta avaliação é efectuada em estudos que se decorrem entre os 28 e os 90 dias, permitindo obter informação relevante para o estabelecimento do regime de doses a ser usado nos estudos crónicos (ex. em estudos de carcinogenicidade quando aplicável). Através destes ensaios é ainda possível a determinação do NOAEL (*No observed adverse effect level*- dose máxima para o qual não se observam efeitos

adversos), a obtenção de informações acerca dos órgãos-alvo de toxicidade e da probabilidade de o composto em estudo se acumular no organismo (94).

Regra geral, os ensaios de toxicidade por dose múltipla utilizam 3 níveis de doses, em que a dose mais elevada deverá produzir toxicidade óbvia mas sem causar a morte e a mais baixa não deverá provocar toxicidade. Os modelos animais utilizados são mamíferos (roedores e não roedores) e a via de administração deverá mimetizar a via de administração escolhida para os ensaios clínicos em humanos (94).

Avaliação da toxicocinética.

O objectivo primordial da avaliação da toxicocinética consiste em analisar a exposição em animais teste, a sua relação com a dose usada e o tempo de exposição ao longo do estudo. Outros dos objectivos destes ensaios são:

- Relacionar a exposição nos estudos de toxicidade com os sinais de toxicidade e contribuir para a determinação da relevância destas informações para a avaliação da segurança nos ensaios clínicos.
- Auxiliar na escolha das espécies e do regime de tratamento para os restantes ensaios pré-clínicos.
- Fornecer informações que conjuntamente com os dados toxicológicos obtidos contribuam para o *design* dos estudos pré-clínicos posteriores (95).

Estes objectivos são alcançados normalmente através da avaliação de um ou mais parâmetros farmacocinéticos (como por exemplo a concentração máxima e concentração ao longo do tempo em amostras sanguíneas e plasmáticas do composto original e/ou dos seus metabolitos), realizando medições em tempos determinados ao longo do estudo. A exposição sistémica deverá ser estimada num número apropriado de animais (mamíferos roedores ou não roedores) com diferentes doses de modo a poder ser possível obter uma base para a determinação do risco (95).

Ensaio de toxicidade na função reprodutora.

O principal objectivo dos ensaios de toxicidade na função reprodutora é revelar qualquer efeito da substância activa em estudo na reprodução dos mamíferos. De modo a poder extrapolar os resultados para o Homem, as informações acerca dos mecanismos de toxicidade na função reprodutora, a comparação entre as farmacocinéticas do modelo

1. Introdução e objectivos.

animal considerado e do Homem e a probabilidade da exposição em humanos deverão ser consideradas (96).

Para execução destes estudos utilizam-se mamíferos, sendo o rato a espécie animal mais frequentemente utilizada. Nos estudos de embriotoxicidade, é comum a utilização de uma segunda espécie animal, neste caso um não roedor, sendo o coelho a escolha mais comum (96).

Regra geral, são efectuados três tipos de estudos:

- Estudos de fertilidade.
- Estudos de desenvolvimento peri e pós-natal, incluindo a função materna.
- Estudos de embriotoxicidade e teratogenicidade (96).

Ensaio de genotoxicidade.

Os ensaios de genotoxicidade poderão ser ensaios *in vivo* e *in vitro* e destinam-se a detectar alterações genéticas induzidas pelos compostos em estudo pelos mais diversos mecanismos. Estes testes permitem a identificação de riscos no que diz respeito à capacidade de provocar danos no DNA na forma de mutações genéticas, danos cromossomais em larga escala ou recombinações. Alterações no número de cromossomas também podem estar associados a fenómenos de carcinogenicidade e indicam um potencial de aneuploidia nas células germinativas. Os compostos que originam resultados positivos nestes ensaios apresentam a possibilidade de serem carcinogénicos e/ou mutagénicos humanos (97).

Regra geral, de modo a avaliar a genotoxicidade de um determinado composto podem existir duas opções que vão constituir a série convencional de ensaios de genotoxicidade:

Opção 1:

- Um teste de mutação genética em bactérias (teste de Ames).
- Um teste citogenético para avaliação dos danos cromossomais (o ensaio *in vitro* de aberração cromossomal na metafase ou o ensaio *in vitro* do micronúcleo) ou o ensaio *in vitro* de mutação do gene tk em ratinhos com linfoma.
- Uma avaliação *in vivo* da genotoxicidade, normalmente através de um teste de danos cromossomais utilizando células hematopoiéticas de roedores, usando o

ensaio do micronúcleo (ver ponto 1.5), ou o ensaio de aberração cromossomal nas células em metáfase.

Opção 2:

- Um teste de mutação genética em bactérias (teste de *Ames*).
- Uma avaliação *in vivo* da genotoxicidade em dois tecidos, normalmente um ensaio do micronúcleo usando células hematopoiéticas de roedores e um segundo ensaio *in vivo* (ex. ensaio do micronúcleo em células eritróides do sangue periférico ou ensaio *in vivo* de lesões cromossomais em células de roedores) (97).

Para além destes ensaios, outras metodologias poderão ser utilizadas de modo a complementar as informações fornecida pela série convencional de testes de avaliação da genotoxicidade (97). Algumas destas abordagens incluem: testes baseados na avaliação de aductos com o DNA, na quebra das cadeias deste e na sua capacidade de reparação ou recombinação e permitem completar e aprofundar as informações obtidas nos ensaios de genotoxicidade convencionais (98).

Ensaio de carcinogenicidade.

Os ensaios de carcinogenicidade têm como principal objectivo, a partir da identificação do potencial oncogénico nos animais, a determinação dos riscos relevantes para humanos. Os resultados dos estudos de genotoxicidade e avaliação da toxicocinética poderão também fornecer indicações importantes, de modo a determinar a necessidade da elaboração de estudos de carcinogenicidade (99).

A realização de estudos completos de carcinogenicidade em fármacos administrados durante curtos períodos de tempo ou com pouca frequência só se justificará se existirem suspeitas prévias acerca da carcinogenicidade do composto. Vários factores relacionados com o potencial carcinogénico dos compostos poderão ser considerados tais como: demonstração prévia de potencial carcinogénico na família terapêutica à qual pertence o composto, relação estrutura-actividade que sugira potencial carcinogénico, evidência de lesões pré-neoplásicas nos estudos de toxicidade por dose múltipla, retenção do composto original e/ou seus metabolitos ao longo de períodos prolongados provocando reacções nos tecidos ou outras respostas patofisiológicas (99).

Não existe uma estratégia universal que permita avaliar o potencial carcinogénico de todos os fármacos. O esquema básico inclui um estudo de carcinogenicidade de longa duração em roedores e um outro estudo complementar que poderá ser um estudo de

1. Introdução e objectivos.

curta/média duração (fornece indicações acerca de carcinogenicidade do compostos mais rapidamente), ou um segundo estudo de carcinogenicidade de longa duração utilizando outra espécie de roedor (de modo a confirmar os resultados do primeiro estudo de longa duração) (100).

Estudos de tolerância local, de irritação da pele e de fotossensibilidade.

Estes ensaios nem sempre são necessários, mas são obrigatórios para produtos de aplicação cutânea (90).

Vários factores podem condicionar a realização de ensaios para avaliação da fototoxicidade tais como:

- As propriedades fotoeléctricas das moléculas (fotoabsorção e fotoestabilidade).
- Informações acerca do potencial fototóxico de compostos estruturalmente similares com a molécula em estudo.
- Distribuição do composto nos tecidos (moléculas com distribuição preferencial para a pele ou olhos).
- Resultados de outros ensaios (101).

Ensaio de imunotoxicidade.

Os ensaios de imunotoxicidade têm como objectivo identificar o potencial imunotóxico dos compostos e podem ajudar a determinar o tipo de célula afectada, se os efeitos são reversíveis e o seu mecanismo de acção (102).

As razões que poderão levar a considerar a execução de estudos de imunotoxicidade para uma dada molécula em estudo incluem:

- Os resultados de outros estudos de toxicidade,
- As propriedades farmacológicas da molécula – se as propriedades farmacológicas do agente em estudo indicam um potencial para alterar a função imunitária (ex. fármacos anti-inflamatórios).
- A população de pacientes a que esta será destinada – se esta se encontra imunocomprometida devido à doença ou à terapia utilizada.
- Se o composto e/ou seus metabolitos apresenta maior afinidade para as células do sistema imunitário.
- Existência de similaridades estruturais com imunomoduladores conhecidos (102).

Regra geral, os ensaios de imunotoxicidade são conduzidos durante 28 dias com doses diárias do composto e utilizando roedores de ambos os sexos como modelo animal, embora existam adaptações destes estudos que utilizam não roedores. A espécie, estirpe, dose, duração e via de administração usada deverão ser, quando possível, consistentes com os ensaios de toxicidade convencionais em que se observou a ocorrência de imunotoxicidade. A dose mais alta deverá ser superior à dose para a qual não se observam efeitos adversos, mas inferior a níveis que induzam alterações secundárias à ocorrência de *stress*. Recomenda-se ainda a utilização de vários níveis de doses de modo a determinar a relação dose-resposta e a dose para a qual não se observa imunotoxicidade (102).

Avaliação da segurança farmacológica.

A avaliação da segurança farmacológica inclui a análise dos efeitos dos compostos nas funções vitais nomeadamente a nível cardiovascular, sistema nervoso e respiratório. Estes ensaios deverão ser executados antes de o composto em estudo ser testado em humanos (90).

Os estudos específicos a serem conduzidos bem como as metodologias utilizadas variam de acordo com as características dos compostos em análise e a finalidade com que serão utilizados. Os dados obtidos nestes estudos poderão ser úteis para a elaboração de outros estudos de toxicidade, farmacocinéticos, clínicos, etc. (102).

As metodologias utilizadas incluem modelos animais, bem como ensaios *in vitro* ou *ex vivo* que podem abarcar desde órgãos ou tecidos isolados, culturas celulares, fragmentos de culturas celulares, organelos intracelulares, receptores, canais iónicos, transportadores e enzimas (102).

Os ensaios *in vitro* e *ex vivo* constituem sobretudo estudos de suporte de modo a permitir a investigação do mecanismo dos efeitos produzidos *in vivo*, a obtenção do perfil de actividade da substância em estudo ou o estabelecimento de relações dose-resposta (102).

A bateria de ensaios de avaliação da segurança farmacológica pode ainda incluir a avaliação de sistemas de órgãos diversos tais como o sistema urinário, gastrointestinal e o sistema nervoso autónomo, cuja selecção irá depender das características dos compostos em questão (102).

1. Introdução e objectivos.

1.5-O ensaio do micronúcleo no estudo de potencial genotoxicidade.

1.5.1- Características gerais.

Nos últimos anos tem surgido uma grande variedade de métodos a utilizar para avaliação de genotoxicidade (103). Os ensaios citogenéticos *in vivo* avaliam lesões cromossómicas induzidas pela administração dos compostos em estudo, num modelo animal adequado. Os ensaios de genotoxicidade poderão ser também efectuados em culturas de células somáticas com capacidade de divisão mitótica, através de métodos directos (análise das lesões dos cromossomas na metafase) e indirectos (ensaio do micronúcleo) (104).

Na análise das lesões cromossómicas na metafase, os cromossomas são estudados directamente, por observação microscópica e contagem das respectivas lesões - quebras, aberrações ou alteração no número de cromossomas. Esta metodologia permite uma avaliação detalhada, mas a complexidade e o tempo dispendido na sua execução, além do facto de alguns artefactos resultantes de perdas cromossómicas dificultarem a visualização, levou ao desenvolvimento de novas técnicas de mais simples de avaliação e, ainda, à complementação desta com a técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridisation*, hibridização *in situ* com fluorescência) (figura 23) (105).

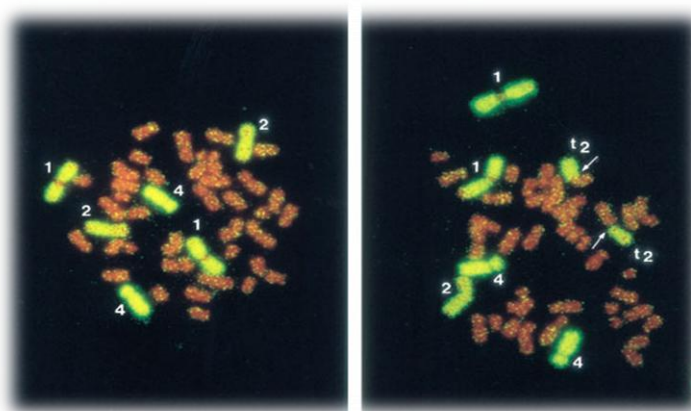


Figura 23- Análise de cromossomas na metafase marcados por FISH. A figura da esquerda mostra uma célula sem aberrações cromossómicas enquanto a figura da direita mostra a existência de uma translocação cromossómica indicada pela seta (adaptado de 106).

Uma outra técnica, de avaliação e execução mais simples, consiste no estudo de alterações cromossómicas baseado na observação de micronúcleos ou corpos de Howell-Jolly em eritroblastos ou em eritrócitos (figura 24) (107). O ensaio do micronúcleo permite

a detecção de aberrações cromossômicas que determinam um comportamento anormal dos cromossomas na anafase (103). Os micronúcleos são corpos citoplasmáticos de origem nuclear que correspondem a material genético que não foi incorporado no núcleo das células-filhas durante a divisão celular. Estes, podem reflectir a existência de quebras de cromossomas, “*cross-linking*” ou perda de cromossomas induzidas por agentes genotóxicos (108).

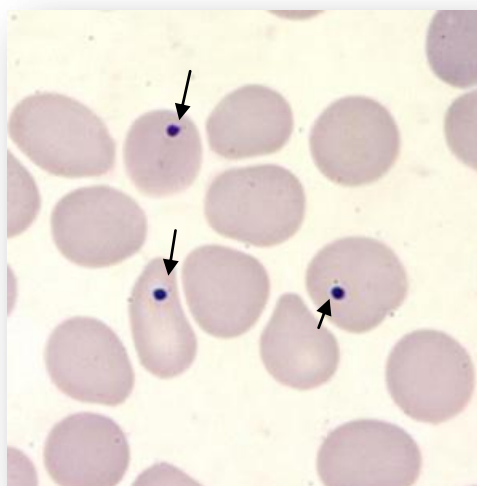


Figura 24- Esfregaço sanguíneo corado com corante de Giemsa, no qual se observam alguns eritrócitos com micronúcleos (assinalados com uma seta) (adaptado de 109).

Os micronúcleos podem corresponder fragmentos de cromossomas (fragmentos acêntricos) e/ou cromossomas inteiros, que foram incapazes de migrarem para os pólos do fuso acromático durante a mitose (110). Durante a mitose, o material genético contido no núcleo celular replica-se e divide-se equitativamente dando lugar a duas células-filhas idênticas. Porém, este processo poderá ocorrer de maneira errónea, devido a alterações que ocorrem na síntese do DNA ou na molécula do DNA, por acção de agentes genotóxicos, originando rupturas cromossômicas ou perdas de cromossomas inteiros. Neste caso, o material genético não será incorporado na célula-filha, originando um núcleo de menor tamanho que o núcleo principal (figura 25), designado por “micronúcleo” e facilmente identificável ao microscópio (108).

1. Introdução e objectivos.

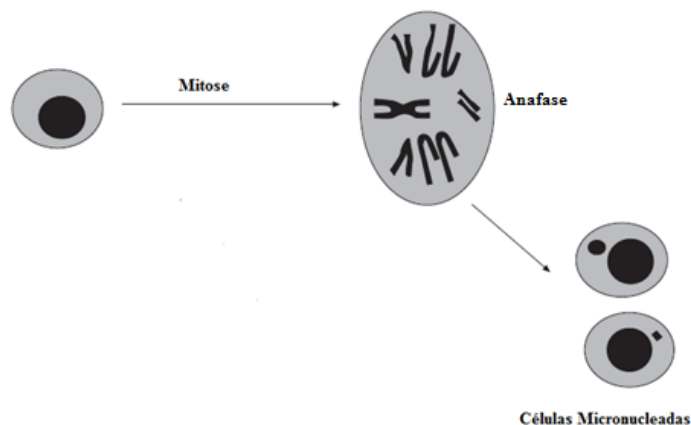


Figura 25- Esquema representativo da formação dos micronúcleos, sendo um deles formado devido à perda de um cromossoma inteiro e outro devido à perda de fragmentos cromossómicos (adaptado de 108).

O ensaio do micronúcleo constitui uma das metodologias mais utilizadas para a identificação dos efeitos genotóxicos de um composto (111). Algumas das vantagens desta técnica incluem o facto de ser uma metodologia simples e rápida de executar, fornecendo informações acerca da ocorrência de aberrações cromossómicas, não ocorrência de disjunções ou de outros parâmetros mais específicos, como o índice de proliferação celular ou a existência de fenómenos apoptóticos (103).

O ensaio do micronúcleo é apenas aplicável a células eucarióticas, ou seja, não é possível efectuar este ensaio em populações celulares que não possuam capacidade de divisão celular ou que tenham uma cinética de divisão celular ainda não completamente compreendida ou controlada (105).

Os micronúcleos observados deverão apresentar as seguintes características:

- Diâmetro de cerca de 1/16 a 1/3 do diâmetro médio do núcleo principal.
- Serem facilmente distinguíveis de artefactos, devido ao facto de não serem refrácteis.
- Não se encontrarem ligados ao núcleo principal.
- Poderão tocar, mas não podem sobrepor o núcleo principal, devendo distinguir-se o limite do micronúcleo e do núcleo principal.
- Apresentarem a mesma intensidade de coloração do núcleo principal, embora ocasionalmente possam aparecer com uma tonalidade mais intensa (105).

A medula óssea e o sangue periférico constituem dois dos tecidos mais utilizados para do ensaio do micronúcleo. No entanto, podem ser também usados outros tecidos, como o tecido hepático, pulmonar, dérmico ou esplénico (112).

A contagem de micronúcleos em células eritróides do sangue periférico e da medula óssea constitui um dos procedimentos mais comuns para avaliar a genotoxicidade dos agentes em estudo (113). Quando na medula óssea, um eritoblasto policromatófilo é convertido num reticulócito, o núcleo é expelido e qualquer micronúcleo que se tenha formado irá permanecer no citoplasma, sendo assim facilmente detectável (figura 26) (114). A observação de eritoblastos, células que rapidamente se diferenciam nos restantes precursores da linha eritróide, permite avaliar a formação recente de micronúcleos, fáceis de detectar e analisar (103).

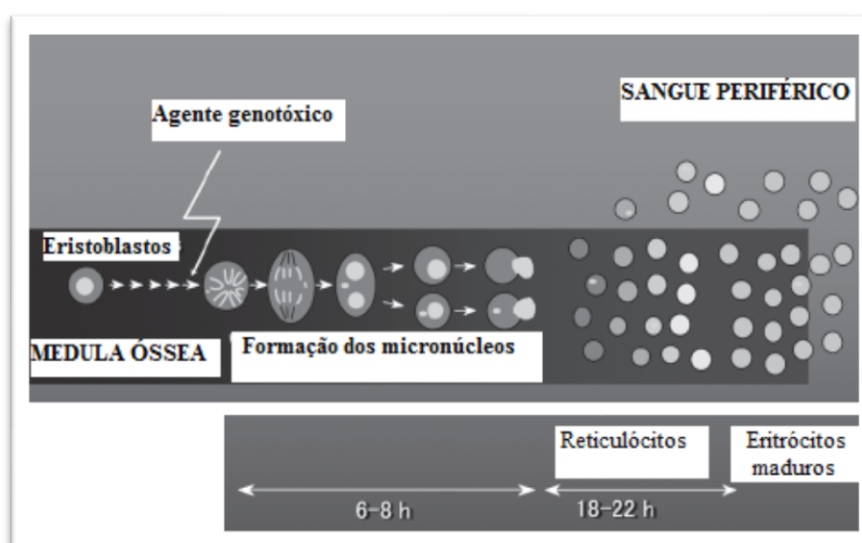


Figura 26- Cinética da formação dos micronúcleos nos eritoblastos da medula óssea (adaptado de 115).

Actualmente, o ratinho é o modelo animal escolhido para a realização do ensaio do micronúcleo, embora o rato também possa ser usado. O baço de alguns animais, incluindo o do rato e o do Homem, é responsável pela remoção de células eritróides micronucleadas da circulação, bem como de outras células com anormalidades (32). Para o ensaio do micronúcleo no sangue periférico, o modelo animal por excelência é o ratinho pois, ao contrário do que acontece no rato, o baço do ratinho não apresenta capacidade de remoção das células eritróides micronucleadas da circulação periférica, fazendo com que a proporção de eritrócitos e/ou reticulócitos micronucleados seja semelhante na medula óssea e no sangue periférico (112).

A necessidade de maximizar a capacidade de absorção e penetração nas células-alvo e de mimetizar a exposição humana (incluindo a exposição acidental ou ambiental) constituem dois dos factores que condicionam a escolha da via de administração do agente em estudo, sendo normalmente a via oral e intraperitoneal as mais utilizadas (104).

1. Introdução e objectivos.

Para o ensaio do micronúcleo é mais frequente a utilização de ratinhos macho, pois estes são mais sensíveis à indução do micronúcleo (97). Porém, se existem evidências que indiquem diferenças na toxicidade ou no metabolismo do agente em estudo entre machos e fêmeas, ambos os géneros deverão ser usados (112).

Quanto à idade dos animais a utilizar, a escolha recai em jovens adultos (ratinhos entre 8 a 12 semanas), uma vez que em animais de maior idade a deposição de gordura na medula óssea poderá dificultar a coloração dos esfregaços (104).

O número de animais recomendado é normalmente 5 para cada dose em estudo (104).

No que diz respeito às doses a utilizar, deverão ser usadas pelas menos 3 doses, que deverão cobrir um intervalo que vai desde o aparecimento de toxicidade inequívoca até uma reduzida ou ausência total de toxicidade. Quando as propriedades dos compostos em estudo assim o permitem, será preferível que a dose mais elevada produza alguma indicação de toxicidade na medula óssea (ex. redução da proporção de reticulócitos na medula óssea ou no sangue periférico). Para além disso, os sinais clínicos provocados pelo composto em estudo (incluindo a letalidade) também deverão ser tidos em conta para descrever a toxicidade e determinar a dose máxima tolerada (112).

No ensaio do micronúcleo na medula óssea, regra geral os esfregaços são obtidos 24 horas após a administração do composto em estudo. Seguidamente efectua-se a determinação da % de células eritróides micronucleadas em cada uma das lâminas obtidas (116).

Relativamente ao ensaio do micronúcleo no sangue periférico, as amostras de sangue deverão ser colhidas aproximadamente 24 horas após a administração do agente em estudo. Posteriormente, efectua-se a preparação dos respectivos esfregaços sanguíneos e para cada lâmina poderão ser obtidos os seguintes dados: a % de reticulócitos e de eritrócitos maduros micronucleados, bem como a razão reticulócitos/ eritrócitos maduros (%reticulócitos) (104).

A determinação da percentagem de reticulócitos no sangue periférico poderá também constituir um bom indicador de toxicidade ao nível da medula óssea. Uma redução dessa percentagem poderá resultar da inibição da divisão e maturação das células eritropoiéticas e conseqüente redução da proporção de reticulócitos (104).

Um aumento do número de eritrócitos micronucleados irá despoletar uma eritropoiese ineficaz. A esta redução na produção de eritrócitos segue-se uma estimulação eritropoiética e conseqüente aumento dos níveis de reticulócitos circulantes (104).

A utilização de um grupo de controlo positivo é parte integrante da maioria dos estudos de genotoxicidade, quer *in vitro*, quer *in vivo*. A inclusão de um controlo positivo apresenta diversas vantagens, tais como: facilita a comparação dos resultados de diferentes laboratórios, ajuda a estabelecer os critérios mínimos aceitáveis para o ensaio e permite assegurar que todos os passos do procedimento experimental são cumpridos adequadamente (117).

De modo a reduzir o número de animais utilizados nos ensaios, a utilização de um controlo positivo no ensaio do micronúcleo tem começado a ser questionada pela comunidade científica, nomeadamente pelos laboratórios que demonstraram reprodutibilidade nos ensaios e que conduzem os estudos seguindo a Boas Práticas de Laboratório. A utilização de controlos positivos é, portanto, desejável, mas não necessária, quando a concentração e a estabilidade do composto em estudo são verificadas de acordo com as boas práticas de laboratório (117). Pelo contrário, a utilização de um grupo de animais de controlo negativo, aos quais é administrado apenas o solvente, recebendo um restante tratamento igual aos outros animais, deverá ser sempre incluído nestes ensaios (112).

O ensaio é positivo quando existe um aumento significativo de células eritróides micronucleadas, quando comparado com o controlo negativo, e esse aumento está relacionado com a dose administrada do agente em estudo (118). Caso nenhum destes critérios seja cumprido, o ensaio será considerado negativo (119).

Um resultado positivo no ensaio do micronúcleo constitui uma indicação de que o composto em estudo é capaz de provocar quebra ou perda de cromossomas em células eritróides da medula óssea do modelo animal utilizado, sob as condições determinadas pelo ensaio (104).

Os resultados pouco definidos deverão ser clarificados, recorrendo a outros ensaios (ex. análise das lesões dos cromossomas na metafase) ou utilizando o ensaio do micronúcleo mas com alterações no respectivo procedimento experimental (ex. tratamento agudo com doses mais elevadas) (112).

A possibilidade de o composto em estudo e/ou de os seus metabolitos atingirem a circulação sanguínea ou o tecido-alvo, isto é, de apresentarem toxicidade sistémica deverá ser avaliada. Para tal, alguns parâmetros poderão ser determinados, nomeadamente, a

1. Introdução e objectivos.

concentração do composto em estudo na medula óssea ou no sangue periférico, especialmente em casos de resultados negativos com compostos que não induzam sinais de toxicidade observáveis (112).

A sensibilidade do ensaio é condicionada pela capacidade da forma activa do agente em estudo atingir o tecido-alvo. Assim, o ensaio do micronúcleo com células eritróides poderá não ser apropriado para a detecção de efeitos de compostos instáveis ou cujos metabolitos tenham um tempo de semi-vida demasiado baixo para atingir a medula óssea (112).

1.5.2- Aplicações do ensaio do micronúcleo.

O ensaio do micronúcleo constitui uma metodologia que poderá ser utilizada com diversas finalidades:

- Comparar a taxa de alterações genotóxicas entre populações expostas a agentes ambientais e ocupacionais distintos.
- Determinar as diferenças na sensibilidade às radiações, entre pacientes que apresentem maior risco de cancro, quer como meio de previsão do risco de cancro, quer para optimização da radioterapia.
- Determinar o potencial genotóxico de novos fármacos sintetizados pelas indústrias agroquímica ou farmacêutica (120).

O ensaio do micronúcleo poderá ainda ser utilizado como rastreio inicial para avaliação da segurança ou, utilizando um protocolo mais elaborado, para uma avaliação mais extensa dos riscos associados a um composto em estudo (104).

Este ensaio faz parte das directivas da ICH como um dos ensaios de genotoxicidade necessários para o desenvolvimento de novos fármacos, constituindo uma metodologia universalmente aceite e tecnicamente acessível, que tem demonstrado a sua inequívoca utilidade na avaliação da instabilidade genética induzida por agentes genotóxicos (108, 113).

A importância das alterações cromossómicas na etiologia cancerígena tem merecido destaque nos últimos anos, devido aos avanços na investigação tumoral. Embora se assuma há muito tempo a existência de uma relação entre algumas neoplasias e alterações cromossómicas específicas, verificou-se mais recentemente uma associação entre a ocorrência de rearranjos cromossómicos e o aparecimento de tumores (ex. linfoma de Burkitt) (104).

A avaliação do potencial genotóxico de qualquer agente biológico, químico ou físico constitui uma etapa importante na determinação do potencial carcinogéneo dos mesmos. Sendo a técnica do micronúcleo uma das metodologias frequentemente utilizada para a detecção de compostos genotóxicos, passou a constituir também um auxiliar para a avaliação da carcinogenicidade dos compostos (121).

A exposição repetida a agentes citostáticos poderá levar ao aparecimento de efeitos adversos, tais como mutações, imunotoxicidade ou até cancro, uma vez que estes compostos poderão induzir danos genéticos e alterar o mecanismo de divisão em células que se multiplicam rapidamente. Muitos destes agentes provocam também um aumento significativo do número de micronúcleos. Verificou-se, por exemplo, que trabalhadores de zonas hospitalares ou de fábricas, cujo trabalho diário requeria uma exposição diária a agentes genotóxicos, apresentavam uma maior frequência de células micronucleadas (108).

O uso do ensaio do micronúcleo como biomarcador tumoral assenta no facto de que nas células tumorais é possível encontrar diversas alterações citogenéticas, o que sustenta a hipótese de que os danos cromossómicos possam estar directamente envolvidos na etiologia do cancro. Porém, será fundamental a confirmação deste pressuposto, de modo a validar a análise da frequência de micronúcleos como um indicador do risco de cancro (122).

A associação entre a frequência de micronúcleos e o desenvolvimento de tumores é apoiada ainda pela:

- Elevada frequência deste biomarcador em pacientes oncológicos não tratados (110).
- Correlação inversa entre a frequência de micronúcleos e a concentração sanguínea e/ou o consumo de certos micronutrientes associados à redução do risco de cancro (110).
- Alguns estudos mostram que a frequência de aberrações cromossómicas (e consequentemente a frequência de micronúcleos devido à relação entre estes dois factores) nos linfócitos do sangue periférico poderá funcionar como indicador do risco de cancro, em indivíduos saudáveis (110). Num desses estudos, verificou-se que no ensaio do micronúcleo com bloqueio na citocinese, usando culturas de linfócitos do sangue periférico, a frequência de linfócitos micronucleados era mais elevada em indivíduos que não tinham cancro, mas que o desenvolveram nos 14 anos seguintes, do que nos indivíduos que até ao fim do estudo continuaram a não apresentar qualquer tumor. A associação entre índices de micronúcleos elevados e o risco de desenvolvimento de cancro

1. Introdução e objectivos.

não foi específica de qualquer tipo de cancro, verificando-se aumento de 2,5 a 3,5 vezes em diversos tipos de tumores (122).

É difícil, no entanto, estabelecer uma relação causal entre a frequência de células micronucleadas e o risco do desenvolvimento de tumores, uma vez que uma elevada frequência de micronúcleos poderá ser consequência do desenvolvimento de uma outra doença por parte do paciente, ou reflectir a susceptibilidade individual a fenómenos de instabilidade genética (110).

1.5.3- Optimização e automatização do ensaio do micronúcleo.

Uma das limitações inicialmente apontadas a este ensaio era a impossibilidade de distinguir os micronúcleos formados por cromossomas inteiros ou por fragmentos acêntricos. A avaliação do tamanho dos micronúcleos formados não deve ser usada, pois, sendo o tamanho dos cromossomas muito heterogéneo, um pequeno micronúcleo poderá conter um cromossoma inteiro ou um pequeno fragmento. Esta restrição poderá ser ultrapassada através da utilização de sondas com fluorocromos, que são específicas para o DNA e para os centrómeros do cromossoma (105).

A combinação do ensaio do micronúcleo com a técnica de FISH, utilizando uma sonda específica para a região pericentrométrica dos cromossomas, permite a discriminação entre micronúcleos que contêm um cromossoma inteiro (micronúcleos que contêm centrómero, logo serão detectados pela sonda) e os micronúcleos que apenas contêm um fragmento acêntrico do cromossoma (como estes não contêm centrómero não serão detectados pela sonda) (123).

Com a técnica de FISH (figura 27), utilizam-se sondas pericentroméricas de DNA que têm a capacidade de marcar a heterocromatina pericêntrica de todos os cromossomas, excepto do cromossoma Y (112). A detecção do sinal no micronúcleo indica que este contém um cromossoma inteiro enquanto a ausência desse sinal indica que o micronúcleo tem origem numa quebra cromossómica (124).

A técnica de FISH poderá ser aplicada a todos os tipos de células que contenham micronúcleos. Esta metodologia requer a contagem de 200 micronúcleos com o auxílio de um microscópio de fluorescência, com os filtros adequados (112).

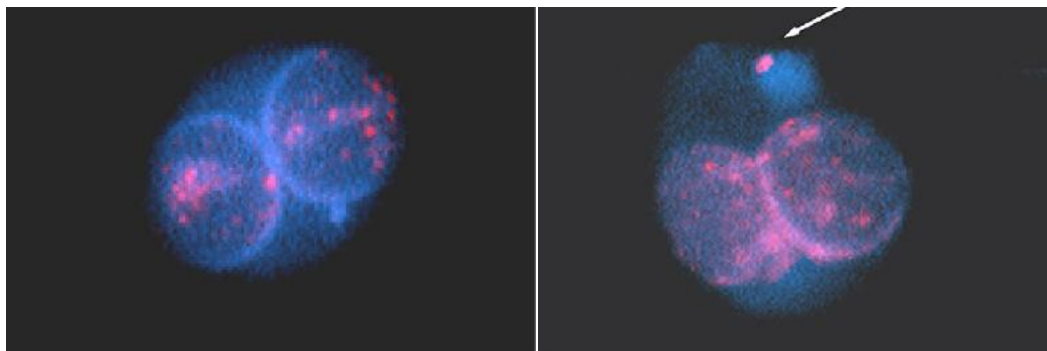


Figura 27- Resultado da associação do ensaio do micronúcleo com a técnica de FISH: linfócito binucleado com um micronúcleo sem centrómero (à esquerda) e linfócito binucleado com um micronúcleo com centrómero e assinalado com uma seta (à direita) (adaptado de 125).

A técnica de FISH constitui uma metodologia um pouco morosa e dispendiosa mas apresenta boa especificidade, permitindo a utilização de sondas para cromossomas específicos (105). A principal limitação do método de FISH é a de não permitir a distinção entre eritrócitos e reticulócitos (112).

Esta metodologia é considerada uma abordagem útil para a detecção das propriedades aneugénicas ou clastogénicas dos compostos no ensaio do micronúcleo. No entanto, actualmente a complexidade dos métodos limita a sua utilização a situações específicas, como por exemplo àqueles casos em que se suspeita que o agente em estudo provoque alterações no fuso acromático (devido à presença de micronúcleos de grandes dimensões, à indução de poliploidia, etc.) (112).

Tal como em outras metodologias, a automatização da técnica do micronúcleo permite aplicar a metodologia a estudos de larga escala (103).

O facto de o número de células com micronúcleo observadas ser normalmente muito baixo, faz com que a contagem manual por microscopia seja um processo muito moroso e pouco sensível. Nos últimos tempos, têm sido desenvolvidas diversas técnicas de contagem automática, que permitiram a obtenção de resultados mais rapidamente e com uma melhor sensibilidade (112).

As características dos micronúcleos, nomeadamente o facto de serem estruturas que coram fortemente, facilitam o processo de automatização para a sua contagem por citometria de fluxo ou por análise de imagens. Estes procedimentos poderão no futuro substituir o processo de contagem manual, pois permitem a obtenção de resultados de uma maneira mais rápida e com maior sensibilidade e reprodutibilidade (126).

1. Introdução e objectivos.

A análise de imagens constitui uma metodologia potencialmente útil e, devido à relação próxima desta abordagem com a contagem manual por microscopia, é possível utilizar a imagem para a validação da contagem manual (126). Na análise de imagens, amostras de medula óssea são aplicadas em lâminas de vidro antes da contagem, pelo que a qualidade das lâminas preparadas é essencial para o sucesso desta metodologia. Mais recentemente, foram desenvolvidos sistemas de análise de imagens que não requerem pré-purificação, aumentando a eficiência de todo o processo, sendo que alguns deles permitem o uso de esfregaços corados com o corante de Giemsa. O microscópio está associado a um computador através de uma câmara de vídeo (figura 28). As células são identificadas de acordo com algoritmos, que consideram parâmetros como a cor, tamanho e forma das células eritróides. A sofisticação e fiabilidade destes algoritmos são evidenciadas pela elevada correlação existente entre a frequência de células micronucleadas contadas manualmente e com esta metodologia (112).



Figura 28- Sistema de análise de imagens para avaliação dos eritrócitos micronucleados (adaptado de 127).

Dado, o elevado ritmo a que novos computadores com processadores mais rápidos têm aparecido, é muito provável que esta metodologia apresente futuramente novas actualizações e evoluções (112).

As potencialidades do ensaio do micronúcleo são ainda melhor exploradas quando a este se associa a análise por citometria de fluxo (114). Esta técnica permite realizar

estudos envolvendo um elevado número de células, apresentando uma boa sensibilidade e reprodutibilidade (128).

Contrariamente às metodologias baseadas em microscopia, a citometria de fluxo realiza a contagem das células numa solução aquosa. As células passam em fila única por um capilar através de um feixe de luz focalizado, provocando a dispersão da luz, em seguida os sinais de fluorescência serão detectados por tubos fotomultiplicadores e analisados por um computador (figura 29). Os primeiros sistemas não tinham a capacidade de distinguir os eritrócitos micronucleados dos reticulócitos micronucleados, porém os mais recentes já o permitem, através da utilização de dois fluorocromos (Hoecht 33342 e o laranja de tiazol) que coram respectivamente o DNA e o RNA ou através do laranja de acridina que permite também a distinção entre os eritrócitos e os reticulócitos (112).

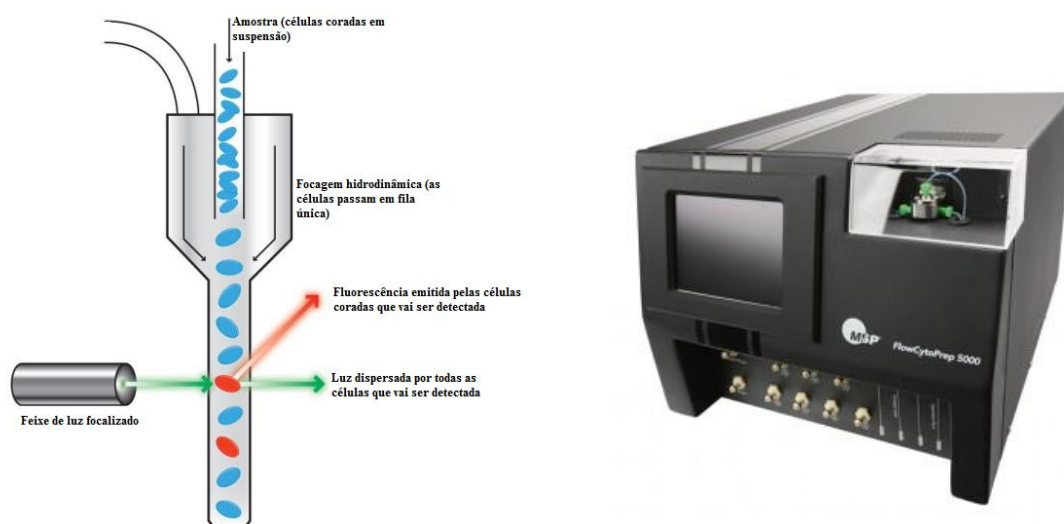


Figura 29- Representação esquemática do funcionamento (à esquerda) de um citômetro de fluxo (à direita) (adaptado de 129 e 130).

Uma vantagem da citometria de fluxo relativamente aos métodos manuais e à análise de imagens é a velocidade de análise das amostras em estudo (126). Os citômetros de fluxo modernos permitem a contagem de dezenas de milhares de reticulócitos e centenas de milhares de eritrócitos micronucleados em apenas alguns minutos (112).

As principais limitações da citometria de fluxo são a actual falta de metodologias viáveis para a análise da medula óssea e o facto de a instrumentação necessária para tal não estar disponível em todos os laboratórios. Existe ainda a possibilidade de formação de

1. Introdução e objectivos.

artefactos fluorescentes, pelo que as amostras deverão ser examinadas microscopicamente quando se verifica um resultado positivo duvidoso, de modo a confirmar as características das células micronucleadas (131).

As metodologias de citometria de fluxo e de análise de imagens poderão no futuro substituir as metodologias de contagem manual por microscopia, devido ao facto de fornecerem resultados mais rapidamente e mais fiáveis. No entanto, torna-se necessário o desenvolvimento de sistemas de validação e de controlo de qualidade rigorosos, que permitam o uso pleno das metodologias automatizadas (112).

1.6- Objectivos.

Conforme o referido no ponto 1.3.1, o CEQUIMED (Centro de Química Medicinal) sintetizou uma tioxantona (TXA1) que revelou actividade antitumoral muito promissora em ensaios *in vitro*. A TXA1 foi testada em algumas linhas tumorais, nomeadamente nas linhas de adenocarcinoma mamário (MC7), de carcinoma pulmonar (NCI-H460) e de melanoma (A375) apresentando valores de GI50 (concentração necessária para inibir 50 % do crescimento celular) abaixo dos 10 μM . O mesmo composto foi ainda testado em linhas leucémicas, mais especificamente em linhas da fase blástica da leucemia mielóide crónica (K562) apresentando valores de IC50 na ordem dos 1,9 μM (132).

Devido a estar em curso a introdução de uma patente que incide sobre esta substância, não é possível revelar aqui a totalidade da sua estrutura química. Contudo, para o trabalho aqui apresentado, as partes estruturais da TXA1 mostradas na figura 30 são suficientes para o seu acompanhamento e compreensão. Assim, a TXA1 apresenta um esqueleto tioxantónico e uma cadeira lateral aminada.

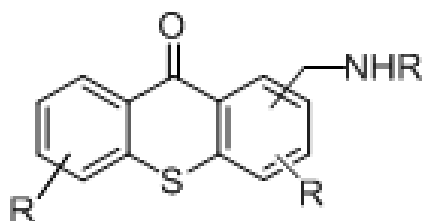


Figura 30- Estrutura base da TXA1.

Neste trabalho pretendeu-se otimizar o processo de síntese da TXA1. Devido à sua baixa solubilidade em água, obteve-se também a TXA1 na forma de cloridrato. Obtiveram-se quantidades significativas destas substâncias de modo a efectuar a avaliação da genotoxicidade, através do ensaio *in vivo* do micronúcleo.

2. Resultados e Discussão.

2. Resultados e Discussão.

2.1- Síntese da TXA1.

A TXA1 é o nome dado pelo CEQUIMED a uma tioxantona cujo processo de obtenção e estrutura geral são apresentados na figura 31. O processo de obtenção utilizado usa a reacção entre a tioxantona halogenada apropriada (TX) e uma amina primária (A1), de acordo com as condições descritas por Portela *et al.* (2007) (133) e Lang *et al.* (2001) (134). Esta reacção consiste numa *N*-arilação e processa-se por um mecanismo de substituição nucleofílica aromática (figura 31) originando a tioxantona pretendida e formando-se como principal sub-produto um derivado metoxilado da tioxantona, aqui designado por TXOMe.

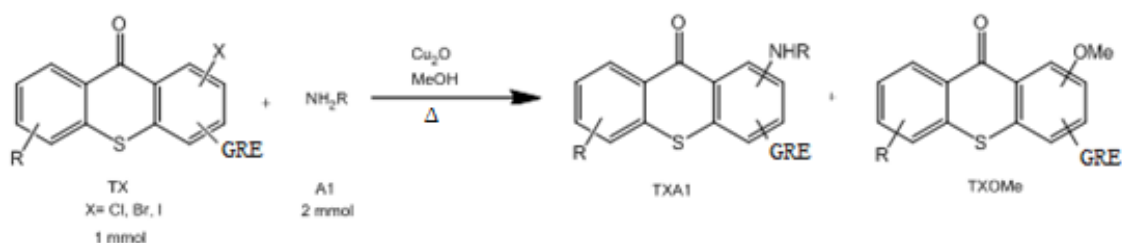


Figura 31- Esquema geral da síntese de tioxantona aminadas por substituição nucleofílica aromática. MeOH= Metanol. Cu₂O= óxido de cobre (I). GRE= Grupo retirador de electrões.

A figura 32 mostra o mecanismo geral da substituição nucleofílica aromática.

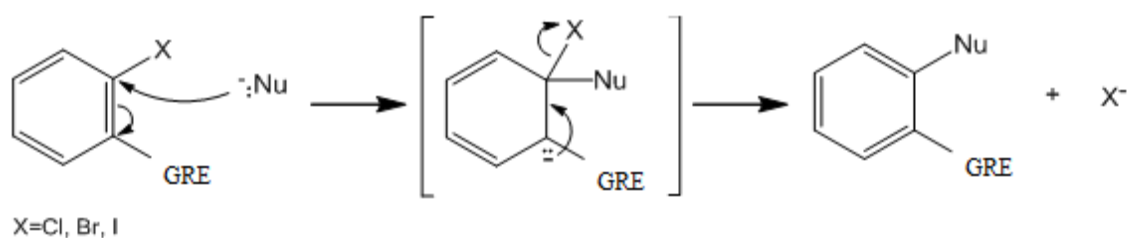


Figura 32- Mecanismo da substituição nucleofílica aromática. GRE= Grupo retirador de electrões; Nu= Nucleófilo. (adaptado de 135).

Nesta reacção há a destacar:

- O ataque do nucleófilo (grupo dador de electrões) que se liga ao carbono do composto aromático que contém o halogénio (carbono pobre em electrões devido à polarização da ligação C – X) e a formação de um intermediário carregado negativamente (carbanião), designado por complexo de Meisenheimer.
- A eliminação do grupo abandonador (normalmente o ião halogeneto) do intermediário carbanião, o que permite refazer a aromaticidade através da formação de uma ligação dupla e obter assim o produto de substituição (135).

As reacções de substituição nucleofílica aromática apenas ocorrem se o anel aromático apresentar substituintes electrofílicos nas posições *orto* ou *para*. A presença destes substituintes naquelas posições permite estabilizar o intermediário carbanião por ressonância, o que não é possível ocorrer quando os substituintes estão em posição *meta* (135).

No caso presente da reacção da tioxantona (TX) com a amina (A1), o azoto amínico de A1 funciona como nucleófilo atacante, o halogénio da tioxantona de partida como electrófilo e o grupo retirador de electrões (GRE), colocado em posição adequada no anel aromático da tioxantona, permite e facilita a reacção.

A utilização de um catalisador metálico permite minimizar algumas das limitações subjacentes a esta reacção. Neste ponto merecem particular realce as reacções catalisadas pela adição de cobre, o que permite o acoplamento entre halogenetos aromáticos com aminas e fenóis para a síntese de arilésteres ou arilaminas (136).

Deste modo, a utilização de um catalisador de cobre nesta reacção poderá ocorrer através de uma reacção de Ullman modificada, a qual constitui uma reacção de acoplamento de halogenetos aromático com o cobre (137).

O primeiro passo deste processo catalítico consiste na formação do complexo [Cu]-Nu que irá catalisar o acoplamento. Posteriormente, o catalisador coordena-se com o halogeneto aromático através de um intermediário de quatro centros. A orientação da coordenação poderá ser determinada atribuindo cargas parciais ao catalisador e ao halogeneto de arilo similares às cargas parciais atribuídas numa reacção de substituição nucleofílica aromática: o halogeneto sendo electronegativo cria uma carga parcial positiva no núcleo aromático, enquanto o cobre apresentando um estado de oxidação +1 faz com

2. Resultados e Discussão.

que o nucleófilo apresente uma carga parcial negativa. No final o complexo $[Cu]-X$ liberta-se ficando o nucleófilo ligado ao anel aromático (figura 33) (137).

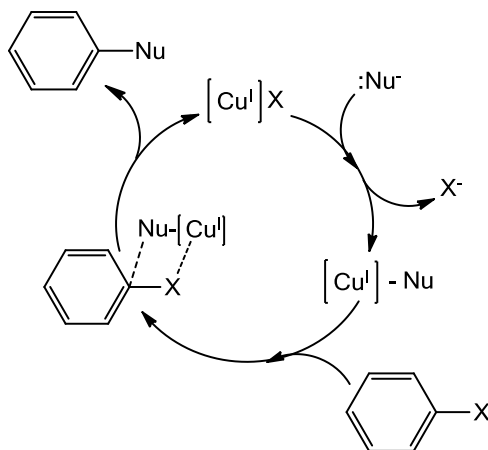


Figura 33- Esquema do mecanismo da reacção catalisada pelo cobre (Cu) (adaptado de 137).

Nas reacções catalisadas pelo cobre com formação de arilaminas é também comum a adição de uma base (como o carbonato de potássio (K_2CO_3), o fosfato de potássio (K_3PO_4) ou o carbonato de céscio (Cs_2CO_3)) à mistura reaccional. A adição de uma base cria um meio alcalino, aumentando-se assim a nucleofilicidade da amina atacante. Relativamente ao solvente a utilizar, solventes hidroxílicos na presença desta base irão favorecer a reacção pretendida (136).

Para atingir o objectivo principal deste trabalho, que é o de avaliar a genotoxicidade da TXA1, é fundamental obter quantidades desta substância compatíveis com as necessidades dos ensaios a efectuar. Assim, foram delineadas duas estratégias com vista a testar qual delas poderia proporcionar maiores quantidades de TXA1, no menor tempo possível.

Assim, e com base em experiências anteriormente efectuadas, foram utilizadas as abordagens seguintes, descritas na tabela 1:

- A) Promover a *N*-arilação numa única reacção em semimicro escala, recorrendo a quantidades de reagentes cinco vezes maiores do que o habitual e na ausência de base,
- B) Efectuar a reacção de *N*-arilação em quadruplicado, usando como base o K_2CO_3

Testaram-se, avaliaram-se e otimizaram-se os rendimentos e tempos de reacção para cada uma das abordagens referidas.

As condições e os resultados obtidos estão descritos na tabela 2. Como se pode verificar, para a síntese da TXA1 é desejável a escolha da estratégia B), que forneceu o maior rendimento (50%) no menor tempo de reacção (24 horas).

Tabela 2- Síntese da TXA1: reagentes, condições e resultados obtidos.

Síntese	TX (mmol)	A1 (mmol)	K ₂ CO ₃ (mmol)	Solvente	Temperatura	Tempo e agitação	Resultados
A	5	10	---	MeOH 200mL	100 °C, na mufla, em vaso fechado.	2 dias, sem agitação.	Rendimento =16%
B	2 (x4)	4(x4)	4 (x4)	MeOH 20 mL	100 °C, na mufla, em vaso fechado.	24 horas, sem agitação.	Rendimento =50%

Conforme anteriormente referido, o nosso grupo testou a influência de vários outros parâmetros que poderiam condicionar a reacção de síntese da TXA1, nomeadamente no que se refere à utilização de outros solventes (próticos, como o isopropanol, e não próticos como o NMP (N- metil 2-pirrolidona) e também de outras metodologias menos convencionais, como por exemplo o recurso ao microondas. Contudo a metodologia desenvolvida neste trabalho (síntese B, tabela 1) foi a que proporcionou melhor rendimento (138).

2. Resultados e Discussão.

Para a purificação do produto de síntese foi utilizado o procedimento resumido na figura 34.

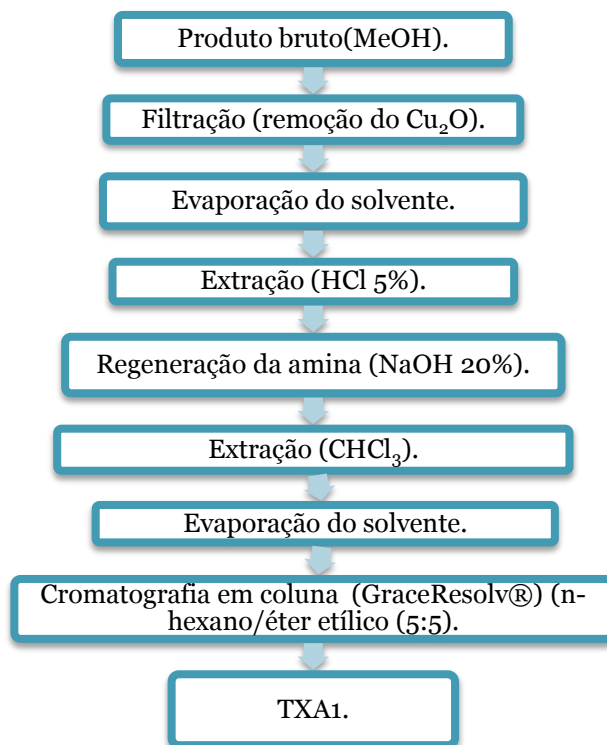


Figura 34- Procedimento adoptado para a purificação da TXA1.

A mistura reaccional foi filtrada de modo a permitir a remoção do óxido de cobre (I) (Cu₂O), o solvente evaporado com ajuda de pressão reduzida e o produto bruto dissolvido em acetato de etilo, efectuando-se posteriormente uma extração múltipla líquido-líquido com uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 5%. Seguidamente, a adição de excesso de hidróxido de sódio (NaOH) a 20% permitiu a regeneração da TXA1 que foi em seguida extraída com clorofórmio (CHCl₃). A fase orgânica foi lavada com água, o solvente evaporado a pressão reduzida e o produto bruto obtido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando cartuchos de sílica- GraceResolv®. A TXA1 foi eluída com uma mistura de n-hexano/éter etílico (5:5).

A pureza do produto obtido foi avaliada por cromatografia em camada fina (CCF), tendo-se observado uma única mancha laranja que não apresentava fluorescência quando nesta incidia a luz ultra-violeta. O composto obtido foi ainda submetido a uma prova cruzada por CCF, em que se comparou o comportamento cromatográfico da substância

obtida e de um padrão de TXA₁ em dois sistemas cromatográficos diferentes com duas fases móveis distintas: clorofórmio/acetona/ trietilamina (80:20:0,1) e clorofórmio/acetona/ trietilamina (50:50:0,1). Esta análise confirmou a identidade do produto da síntese efectuada como correspondendo à substância pretendida, a TXA₁. A TXA₁ obtida na síntese descrita foi ainda caracterizada por espectrofotometria no infravermelho (IV) e por ressonância magnética nuclear de protão (¹H RMN), cujos resultados se discutirão mais adiante.

2.2- Síntese do cloridrato de TXA₁ (TXA₁.HCl).

A obtenção de sais de aminas permite melhorar a biodisponibilidade e a estabilidade de fármacos dotados daquela função química, uma vez que se obtém uma maior estabilidade química e física, além de uma maior solubilidade em água. No caso presente, em que se pretende analisar a genotoxicidade da TXA₁, a obtenção de cloridratos possibilita a preparação de soluções aquosas do composto, o que facilita a execução desse ensaio de toxicidade.

Regra geral, o processo pelo qual os sais de aminas orgânicas são formados inclui uma reacção de neutralização da amina livre com um ácido forte (ex. ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico ou ácido acético) ou com um ácido orgânico. Seguidamente, efectua-se a adição de um solvente que reduz a solubilidade do composto induzindo a insolubilização do sal. Em alternativa, o solvente poderá ser removido deixando apenas o sal formado na forma de resíduo. Outra abordagem passa pelo uso de solventes nos quais o composto original e o respectivo sal apresentem diferentes solubilidades (139).

Para a síntese da TXA₁.HCl (figuras 35 e 36) foi adicionado directamente HCl concentrado em excesso à TXA₁. A suspensão obtida foi deixada em repouso ao longo da noite a -4°C para induzir a insolubilização do cloridrato da TXA₁. Obteve-se um sólido laranja escuro que foi filtrado, lavado com éter etílico para eliminar o excesso de água, evaporado o solvente e conservado num exsiccador com pentóxido de fósforo. No final obteve-se 1,4 g de um sólido alaranjado, correspondendo a um rendimento de 51%.

2. Resultados e Discussão.

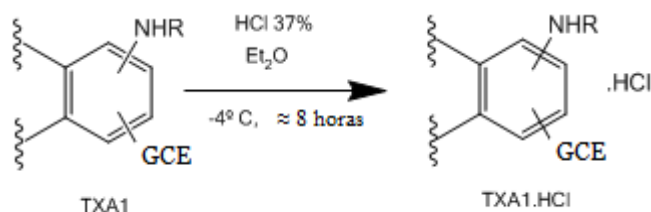


Figura 35- Esquema de formação da TXA1.HCl. Et₂O= Éter etílico.

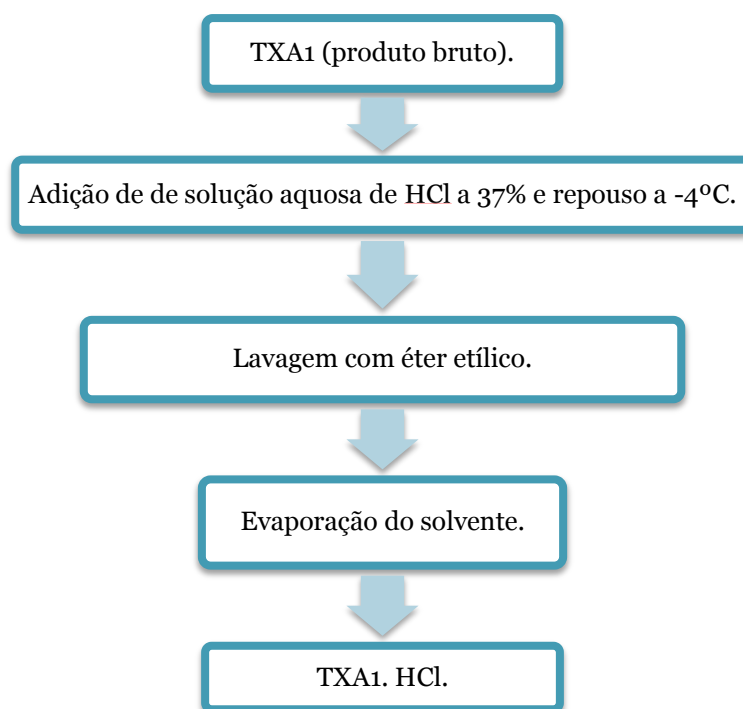


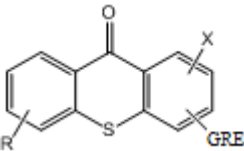
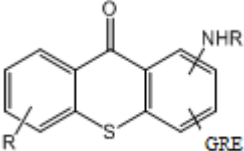
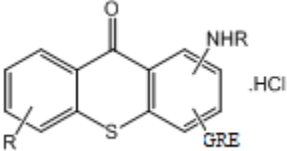
Figura 36- Procedimento adoptado para a síntese e isolamento da TXA1.HCl.

De modo a avaliar a eficácia da formação do cloridrato como processo de purificação, efectuou-se a adição de uma solução aquosa de NaOH a 20%, que permitiu a transformação da TXA1.HCl em TXA1. Em seguida efectuou-se uma análise de CCF [fase estacionária: placa de sílica gel GF254; fase móvel: mistura de clorofórmio/acetona/trietilamina (80:20:0,1)] onde se observou uma única mancha com factor de retenção (Rf) igual ao da TXA1. Assim, o procedimento adoptado é adequado para a formação do cloridrato da TXA1.

2.3- Caracterização estrutural.

A caracterização estrutural da TXA1 e TXA1.HCl foi efectuada por espectroscopia no IV e ^1H RMN. Como foi referido anteriormente, devido a razões de confidencialidade as estruturas das moléculas não serão reveladas. Os dados obtidos pela TX, TXA1 e TXA1.HCl são apresentados nas tabelas 3 (IV) e 4 (^1H RMN).

Tabela 3- Dados da análise por espectroscopia no IV da TX, TXA1 e TXA1.HCl.

Composto	Grupo	Faixa de absorção (cm ⁻¹)
TX 	C=O	1616
	C=C (Aromático)	1590, 1578, 1553
	C-H	2960, 2932, 2876
TXA1 	N-H	3410
	C-N	1246
	C=O	1614
	C=C (Aromático)	1566, 1504,
	C-H	2967, 2928, 2873, 2814
TXA1.Cl 	N-H	3425
	C=O	1614
	C=C (Aromático)	1573, 1508
	C-H	2960, 2930, 2874
	N ⁺ H - - Cl ⁻	2655

Os dados obtidos por espectroscopia no IV da TX (tabela 3 e anexo 1) indicam a presença de uma banda intensa da responsabilidade do grupo C=O (1616 cm⁻¹) e uma série de bandas de intensidade média que correspondem às ligações aromáticas C=C (1590 cm⁻¹, 1578 cm⁻¹, 1553cm⁻¹) típica dos compostos tioxantónicos. É ainda possível observar a presença de 3 bandas típicas das vibrações das ligações C-H (2960 cm⁻¹, 2930 cm⁻¹, 2874

2. Resultados e Discussão.

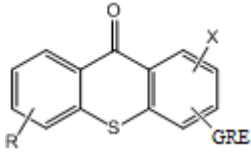
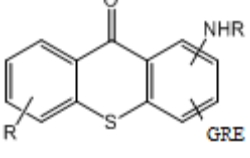
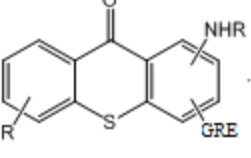
cm⁻¹) que indicam a presença dos substituintes alifáticos existentes neste derivado tioxantônico.

O espectro no IV da TXA1 (tabela 3 e anexo I) coloca em evidência a presença de uma banda típica indicativa da presença de uma amina secundária, resultante da vibração da ligação N-H (3410 cm⁻¹) e da ligação C-N (1246 cm⁻¹). Estão também presentes as bandas da responsabilidade do grupo C=O (1614 cm⁻¹), das ligações C=C aromáticas (1566 e 1504 cm⁻¹) e das ligações C-H da cadeia alifática da amina (2967, 2928, 2873 e 2814 cm⁻¹) e que constituem um bom indicador da formação do produto desejado.

O espectro no IV da TXA1.HCl (tabela 3 e anexo I) permite observar a presença de bandas características dos grupos funcionais presentes e que surgem também presentes no espectro no IV da TXA1 tais como os alongamentos das ligações C-H aromáticas (2960-2874 cm⁻¹), as vibrações das ligações C=C aromáticas (1573-1508 cm⁻¹), as torsões nos grupos CH₂ (1436 cm⁻¹) e CH₃ (1390 cm⁻¹), além das torsões das ligações C-H para fora do plano dos grupos fenilo monosubstituídos (756 cm⁻¹). Neste espectro merece especial destaque a presença de uma banda a 2655 cm⁻¹ e que corresponde às vibrações ocorridas nos alongamentos das ligações N⁺H-----Cl⁻. Estudos efectuados demonstraram que a formação de um sal de uma amina provoca alterações características no respectivo espectro no IV, nomeadamente uma deslocação da banda da ligação N-H para valores mais elevados (3425 cm⁻¹) e o aparecimento de uma banda de absorção numa região entre os 2800 e os 2000 cm⁻¹ possivelmente associada às vibrações de alongamento ocorridas no grupo -NH₂⁺. Todos estes dados constituem bons indícios da formação da TXA1.HCl (140).

O espectro de ¹H RMN da TXA1 (tabela 4, anexo II) apresenta os sinais característicos para os diferentes substituintes presentes no grupo amina, tais como: δ_H 4,20 (t; J=6,5; CH₂), δ_H 3,97 (t; J=6,5; CH₂), δ_H 3,47 (q; J=6,9; CH₂) e δ_H 1,45 (t; J=7,3; CH₃). O N-H foi observado como um singlete largo e como um deslocamento químico de 12,60 ppm. Para além disso, a TXA1 mostrou ainda um comportamento em ¹H RMN semelhante ao de compostos aromáticos com valores de deslocamentos químicos e de constantes de acoplamento semelhantes aos observados e descritos para a TX (tabela 5, anexo II). Estes resultados confirmam uma vez mais o sucesso obtido no acoplamento entre a TX e a amina A1.

Tabela 4- Dados da análise por ¹H RMN da TX, TXA1 e TXA1.HCl.

Composto	TX	TXA1	TXA1.Cl
			
<u>Deslocamento químico (δ_H) *</u>			
N-H	-	12,60; <i>sl</i> ; 1H	-
H aromático	8,46; <i>dd</i> ; <i>J</i> =8,0 e 1,8; 1H	8,45; <i>d</i> ; <i>J</i> =6,0; 1H	7,52; <i>s</i> ; 1H
	7,60; <i>m</i> ; 2H	7,59; <i>m</i> ; 2H	6,71; <i>s</i> ; 1H
	7,48; <i>m</i> ; 1H	7,44; <i>m</i> ; 1H	6,61; <i>s</i> ; 1H
	7,43; <i>d</i> ; <i>J</i> =8,6; 1H	7,22; <i>d</i> ; <i>J</i> =9,0; 1H	6,33; <i>s</i> ; 1H
	6,99; <i>d</i> ; <i>J</i> =8,6; 1H	6,95; <i>d</i> ; <i>J</i> =9,0; 1H	6,32; <i>s</i> ; 1H
			5,90; <i>s</i> ; 1H
H-C- heteroátomo	4,13; <i>t</i> ; <i>J</i> =6,4; 2H	4,20; <i>t</i> ; <i>J</i> =6,5; 2H	3,19; <i>m</i> ; 4H
		4,05; <i>t</i> ; <i>J</i> =6,9; 2H	3,03; <i>m</i> ; 6H
		3,97; <i>t</i> ; <i>J</i> =6,5; 2H	
		3,47; <i>q</i> ; <i>J</i> =6,9; 2H	
H-alifático	1,94; <i>m</i> ; 2H	1,91; <i>q</i> ; <i>J</i> =7,3; 2H	1,19; <i>m</i> ; 2H
	1,15; <i>t</i> ; <i>J</i> =7,4; 3H	1,45; <i>t</i> ; <i>J</i> =7,3; 6H	1,07; <i>t</i> ; <i>J</i> =7,1; 6H
		1,12; <i>t</i> ; 3H	0,56; <i>t</i> ; <i>J</i> =7,1; 3H

*Os valores do δ_H são expressos em ppm utilizando o tetrametilsilano (Me₄Si) como referência interna. Os valores da constante de acoplamento (*J*) são expressos em Hz. *s*- singlete; *d*- duplete; *t*- triplete, *q*- quadruplete, *m*-multiplete; *dd*-duplo duplete; *sl*- singlete largo.

O espectro de ¹H RMN da TXA1.HCl (tabela 4, anexo II) apresenta um perfil semelhante ao observado com a TXA1. Mesmo assim, é possível observar que no espectro da TXA1.HCl os sinais de deslocamento químico protônico aparecem em valores mais

2. Resultados e Discussão.

baixos quando comparado com o espectro da TXA₁. Além disso, no espectro da TXA₁.HCl não é possível observar o sinal correspondente ao N-H que se encontra presente no espectro da TXA₁. Porém, o espectro de ¹H RMN da TXA₁.HCl apresentou uma menor resolução o que poderá ser explicado pela presença de água não deuterada usada como solvente.

Os resultados obtidos por espectroscopia de ¹H RMN da TXA₁.HCl, conjuntamente com os resultados obtidos por IV confirmam a obtenção do cloridrato e a ausência de reacções colaterais e/ou degradação ou transformação estrutural quando o procedimento de salificação aqui descrito é aplicado na sua síntese.

2.4- Avaliação da genotoxicidade (ensaio do micronúcleo).

A avaliação da genotoxicidade da TXA₁.HCl foi efectuada através do ensaio do micronúcleo *in vivo* e utilizando ratinhos CD1 (murganhos) como modelo animal. O composto em estudo foi administrado por via intraperitoneal, tendo sido necessário para tal a preparação de soluções deste, utilizando o soro fisiológico como solvente.

As doses utilizadas neste ensaio obedeceram aos requisitos estabelecidos pelas directivas da ICH (S2A), as quais determinam a utilização de pelo menos 3 doses, que deverão cobrir um intervalo que vai desde o aparecimento de sinais de toxicidade inequívoca até pouca ou ausência total de toxicidade. Para tal, efectuiu-se um ensaio preliminar com 5 doses (12,5; 25; 50; 100 e 150 mg/Kg), que permitiu estabelecer as três doses a utilizar: 12,5; 25 e 100 mg/Kg, que correspondem a concentrações na ordem dos 5,75; 11,5 e 23 nM.

Os tecidos utilizados para a avaliação da formação de micronúcleos foram o sangue periférico e a medula óssea. Os animais foram sacrificados 24 horas após a administração da solução do composto em estudo, efectuando-se em seguida a recolha dos respectivos tecidos.

No que diz respeito ao ensaio do micronúcleo na medula óssea, o objectivo é determinar o número de eritroblastos e/ou de reticulócitos micronucleados. Porém, nos esfregaços de medula óssea utilizados não foram identificadas células eritróides com micronúcleos.

Relativamente ao ensaio do micronúcleo no sangue periférico (figura 37), os resultados foram expressos em número de eritrócitos micronucleados por 1000 eritrócitos

contados (valor em percentagem). Para cada dosagem foi calculada a média e o erro da média dos respectivos resultados, estando estes apresentados na tabela 4 e na figura 38.

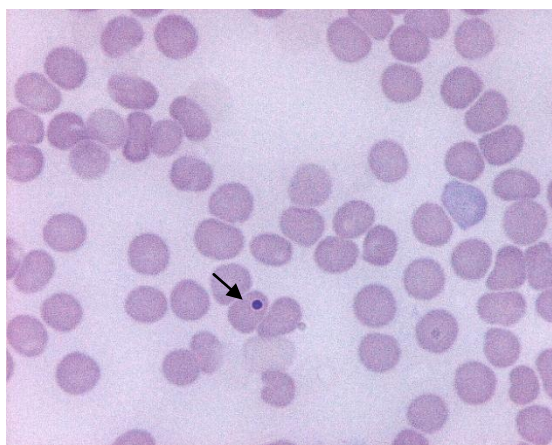


Figura 37- Esfregaço de sangue periférico corado pela técnica de Wright em que é possível observar a presença de um eritrócito micronucleado (indicado pela seta). (Imagem obtida através de um microscópio Nikon Eclipse E400 (Nikon Instruments Europe, Badhoevendorp, Holanda) utilizando uma objectiva de 100x e o sistema de aquisição de imagens Leica Qwin.

Tabela 5- Resultados do ensaio do micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico para as diferentes doses testadas de TXA₁.HCl.

Concentração (mg/Kg)	N	% Eritrócitos micronucleados (média) ± erro da média
0 (controlo negativo)	4	0,083±0,035
12,5	4	0,229±0,053
25	4	0,296±0,063
100	4	0,341±0,081

2. Resultados e Discussão.

Relação entre a frequência de eritrócitos micronucleados (%) e a doses testadas (mg/Kg).

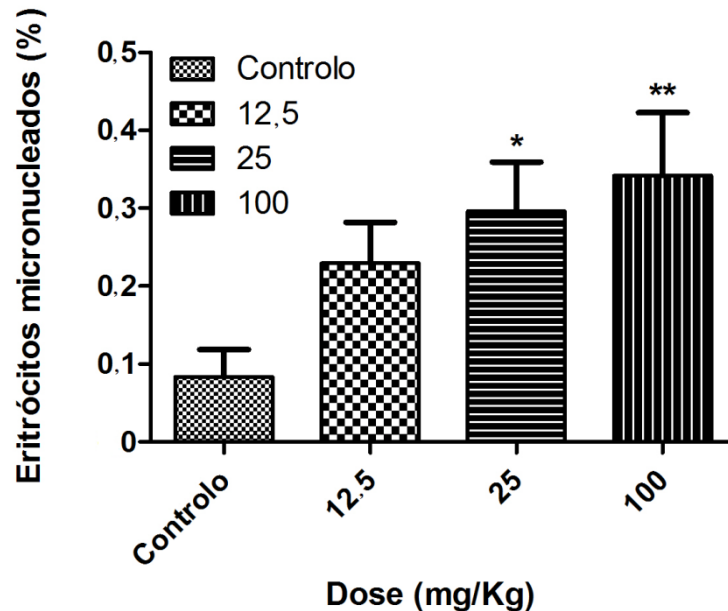


Figura 38- Análise de variação da percentagem de eritrócitos micronucleados no sangue periférico de acordo com a dose de TXA1.HCl administrada. Os resultados estão expressos em percentagem (média \pm erro da média) relativamente a cada uma das doses testadas. As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste LSD *post-hoc*, *One-way* ANOVA, utilizando o grupo em que foi administrado apenas soro fisiológico como controlo negativo. * Indica $P < 0,05$ relativamente ao controlo negativo e **indica $P < 0,01$ relativamente ao controlo negativo. A ausência de * indica um $P > 0,05$ relativamente ao controlo negativo, ou seja, inexistência de significado estatístico.

Os resultados obtidos após 24 horas da administração da TXA1.HCl mostram um aumento da frequência de eritrócitos micronucleados no sangue periférico do modelo animal usado. Este aumento foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$, relativamente ao grupo de controlo negativo) para as duas doses mais elevadas (25 mg/Kg e 100 mg/Kg), na dose de 12,5 mg/Kg o ligeiro aumento observado não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$, relativamente ao grupo de controlo negativo).

De modo a complementar os resultados obtidos, efectuou-se ainda a avaliação da frequência de reticulócitos no sangue periférico (figura 39), uma vez que a sua contagem fornece informação sobre a actividade eritropoiética da medula óssea. Foi avaliado o número de reticulócitos por 1000 eritrócitos contados (expresso em percentagem). Para cada dosagem foi calculada a média e o erro da média dos respectivos resultados, estando estes presentes na tabela 5 e figura 40.

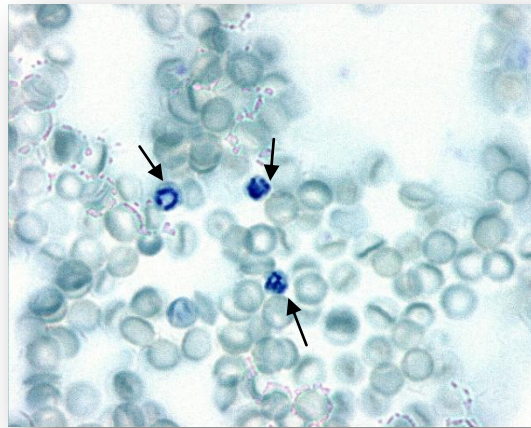


Figura 39- Esfregaço de sangue periférico corado com azul-de-metileno Novo e no qual é possível observar a presença de reticulócitos (indicados pelas setas). (Imagem obtida através de um microscópio Nikon Eclipse E400 (*Nikon Instruments Europe*, Badhoevendorp, Holanda) utilizando uma objectiva de 100x e o sistema de aquisição de imagens Leica Qwin.

Tabela 6- Resultados da contagem dos reticulócitos no sangue periférico para as diferentes doses testadas de TXA1.HCl.

Concentração (mg/Kg)	N	% Reticulócitos (média) ± erro da média
o (controlo negativo)	4	2,463±0,481
12,5	4	3,313±0,590
25	3	3,583±0,592
100	4	2,688±0,484

2. Resultados e Discussão.

Relação entre a frequência de reticulócitos (%) e a doses testadas (mg/Kg).

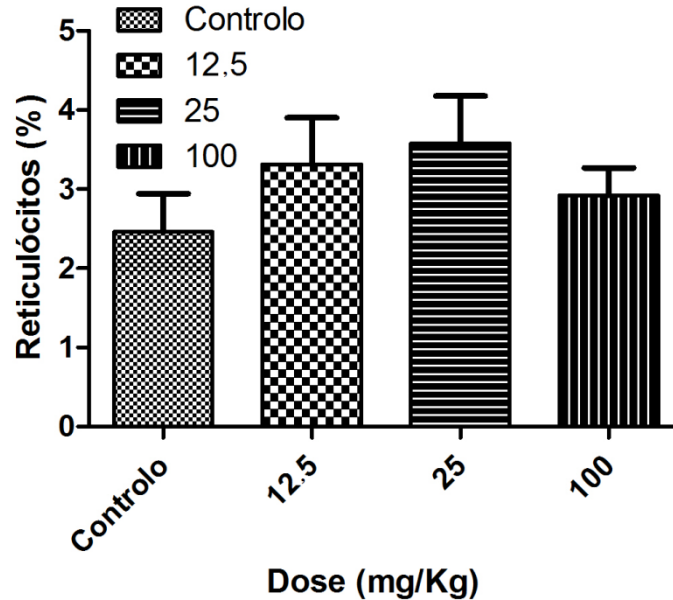


Figura 40- Análise de variação da percentagem de reticulócitos no sangue periférico de acordo com a dose de TXA₁.HCl administrada. Os resultados estão expressos em percentagem (média ± erro da média) relativamente a cada uma das doses testadas. As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste LSD *post-hoc*, *One-way* ANOVA, utilizando o grupo em que foi administrado apenas soro fisiológico como controlo negativo. A ausência de * indica um $P > 0,05$ relativamente ao controlo negativo, ou seja, inexistência de significado estatístico.

Os resultados obtidos mostram que a administração da TXA₁.HCl determinou um aumento da frequência de reticulócitos no sangue periférico do modelo animal usado. No entanto, esta subida não foi estatisticamente significativa em todas as doses utilizadas ($p > 0,05$ relativamente ao grupo de controlo negativo). Esta ligeira subida poderá ser interpretada como um aumento da resposta fisiológica, devido ao acréscimo da frequência de células micronucleadas que terão uma semi-vida menor. A ligeira redução no número de eritrócitos circulantes, por aumento da remoção destas células, determina uma estimulação eritropoiética e, conseqüentemente, a subida dos níveis de reticulócitos (não sendo atingida a dose tóxica para a própria medula óssea) (104).

3. Parte experimental.

3. Parte experimental.

3.1- Reagentes, solventes e métodos gerais.

Os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos à Sigma Aldrich e eram de grau de pureza *pro analysis*.

A purificação da TXA1 (síntese A) foi efectuada por cromatografia em coluna (cromatografia “flash”) utilizando-se cartuchos GraceResolv® (Grace Company, Deerfield, IL, EUA) 5g/25mL. Por sua vez, a monitorização das reacções foi efectuada por CCF utilizando-se como fase estacionária gel de sílica 60 (GF254) com uma espessura de 0,25 mm. Quando algum dos reagentes deixou ser detectado por CCF ou manteve-se constante durante, pelo menos, mais 30 minutos de reacção, a reacção de síntese foi considerada terminada. A CCF foi também utilizada como critério de pureza do produto da reacção efectuada.

Os pontos de fusão foram determinados em microscópio de Köfler.

Os espectros no IV foram obtidos num espectrofotómetro *ATI Mattson Genesis series FTIR (software: WinFrist v.2.10)*, utilizando-se discos de brometo de potássio (KBr) (1%).

Os espectros de ¹H RMN foram obtidos em clorofórmio deuterado (CDCl₃) ou água deuterada (D₂O) à temperatura ambiente num espectrómetro *Bruker Avance 300* (com uma frequência de 300.13 MHz) ou *Bruker DRX-500* (com uma frequência de 500.13 MHz). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ_H (ppm) relativamente ao Me₄Si que funcionou como referência interna.

Os esfregaços sanguíneos foram corados com o corante de Wright (141) para a contagem de eritrócitos micronucleados, e com o corante azul-de-metileno Novo para a contagem de reticulócitos. A contagem celular foi efectuada com o auxílio de um microscópio óptico (objectiva 100x).

3.2- Síntese da TXA1.

3.2.1- Síntese A.

Adicionou-se Cu₂O (2 mg) a uma solução contendo TX (1,5g; 5mmol) e a amina A1 (1,36mL) em 200 mL de metanol. Seguidamente deixou-se a mistura reaccional a 100°C num recipiente fechado e sem agitação durante 24 horas. Depois, a mistura reaccional foi filtrada e o solvente do filtrado foi evaporado com ajuda da pressão reduzida originando um produto bruto de cor castanho escura.

O produto bruto foi dissolvido em acetato de etilo (50 mL) e o composto pretendido foi extraído com uma solução de HCl 5% (3x 100 mL). Em seguida alcalinizou-se a solução com NaOH 20% e realizou-se nova extração com CHCl₃ (3x 25 mL). A solução clorofórmica obtida foi seca com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro, filtrada e o solvente evaporado com ajuda da pressão reduzida. O produto bruto obtido foi depois purificado por cromatografia em coluna com cartuchos GraceResolv® e misturas em diferentes proporções de n-hexano e éter etílico. O composto pretendido eluiu com n-hexano/éter etílico (5:5). Evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, obtendo-se um sólido cor de laranja que corresponde à TXA1 (295mg, η= 16%).

TXA1: Ponto de fusão: 66-69°C; IV (KBr) ν_{max} (cm⁻¹): 3410, 2967, 2928, 2873, 2814, 1614, 1566, 1504; ¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz) δ_H: 12.60 (1H, sl), 8.45 (1H, d, J=6.0), 7.59 (2H, m), 7.44 (1H, m), 7.22 (1H, d, J=9.0), 6.95 (1H, d, J=9.0), 4.20 (2H, t, J=6.5), 4.05 (2H, t, J=6.9), 3.97 (2H, t, J=6.5), 3.47 (2H, q, J=6.9), 1.91 (2H, q, J=7.3), 1.45 (6H, t, J=7.3), 1.12 (3H, t).

3.2.2- Síntese B.

Efectuou-se paralelamente a reacção de síntese de 4 recipientes contendo cada um deles uma mistura de TX (500 mg; 2.0 mmol), amina A1 (0.35mL, 4.0 mmol), K₂CO₃ (393 mg; 4.0 mmol), Cu₂O (2mg) e metanol (20 mL). As 4 misturas reaccionais foram deixadas reagir a 100°C, durante 24 horas e sem agitação. Em seguida, as misturas reaccionais foram reunidas, filtradas e o solvente evaporado com ajuda da pressão reduzida originando um produto bruto de cor castanha. O produto bruto foi depois dissolvido em éter etílico (30 mL), alcalinizado com uma solução aquosa de NaOH 20% e lavado com água (3x 30 mL). A fracção etérea foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado com ajuda da pressão reduzida. O resíduo foi utilizado na reacção seguinte sem ser submetido a qualquer outra purificação.

3.3- Síntese da TXA1.HCl.

Adicionou-se 1 mL de uma solução de HCl a 35% ao resíduo obtido em 2.2. Observou-se a formação de um precipitado cor de laranja e a suspensão foi deixada em repouso a -4°C durante a noite. A solução foi depois filtrada e o resíduo lavado com 90 mL de éter etílico anidro. O sólido obtido, de cor de laranja escuro, foi deixado em exsiccador contendo pentóxido de fósforo e corresponde à TXA1. HCl (1.39g, η= 51%).

3. Parte experimental.

TXA1.HCl: Decompõe-se a temperaturas superiores a 48°C; **IV (KBr)** ν_{\max} (cm⁻¹): 3425; 2960, 2930, 2874, 2655, 1614, 1573, 1508; **¹H NMR** (CDCl₃, 500.13 MHz) δ_{H} : 7.52 (1H, s), 6.71 (1H, s), 6.61 (1H, s), 6.33 (1H, s), 6.32 (1H, s), 5.90 (1H, s), 3.19 (4H, m), 3.03 (6H, m), 1.19 (2H, m), 1.07 (6H, t, J=7.1), 0.56 (3H, t, J=7.1).

3.4- Avaliação da genotoxicidade (ensaio do micronúcleo).

Para o ensaio do micronúcleo *in vivo* na medula óssea e no sangue periférico, o modelo animal eleito foi o ratinho macho adulto CD1 (murganho, peso: 30-35g, laboratórios Charles River, Barcelona, Espanha). Os animais foram divididos em grupos de 4 por dose, mantidos pelo menos 2 semanas antes de serem utilizados em gaiolas de polietileno, com aparas de madeira como cama e sujeitas a uma temperatura controlada de 20 ± 1°C, com uma frequência de 12 horas de luminosidade (luzes ligadas às 08:00h e desligadas às 20:00h) e uma humidade relativa de 50%. A água esteve sempre disponível, enquanto a comida apenas não foi disponibilizada nos dias dos tratamentos. O acondicionamento e tratamento experimental dos ratinhos obedeceram às directivas da Comunidade Europeia relativamente ao uso de animais de laboratório (69).

As soluções de TXA1.HCl foram preparadas em soro fisiológico imediatamente antes da sua administração. O controlo negativo consistiu na injeção intraperitoneal de uma solução de soro fisiológico. O ensaio executado consistiu num ensaio de dose única no qual o TXA1.HCl foi administrado por via intraperitoneal, com um volume de 0,2mL/40g peso corporal. Assim, foram avaliados 3 níveis de dosagem: 12.5, 25 e 100 mg/Kg. Os ratinhos foram sacrificados 24 horas após a administração. Logo de seguida, efectuou-se a recolha de sangue periférico para a execução dos esfregaços sanguíneos.

Os esfregaços sanguíneos foram corados pela coloração de Wright (141) e a contagem dos eritrócitos micronucleados foi efectuada com auxílio de um microscópio óptico (objectiva 100x).

Para efectuar a contagem de reticulócitos utilizou-se uma aliquota de sangue periférico à qual se adicionou o mesmo volume de corante azul-de-metileno Novo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), deixando-os em contacto durante 10 minutos, após os quais se efectuou a preparação dos esfregaços. A contagem dos reticulócitos foi feita com auxílio de um microscópio óptico (objectiva 100x).

Após o sacrifício dos animais, efectuou-se a remoção e corte transversal dos fémures dos animais, recolhendo-se a medula óssea por aspiração com uma seringa contendo uma solução de soro fisiológico com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A suspensão de células obtida foi concentrada, após uma ligeira centrifugação (1000 rpm,

2 minutos). Os esfregaços foram então preparados, corados pela técnica de Wright e a contagem dos eritroblastos micronucleados foi efectuada com auxílio de um microscópio óptico (objectiva 100x).

3.5- Análise estatística.

A análise estatística foi efectuada recorrendo ao programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18 para *Windows*. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado de modo a avaliar se os resultados dos ensaios apresentavam uma distribuição normal. Estes foram apresentados na forma de média \pm erro da média. A comparação entre os diferentes grupos foi realizada utilizando o teste LSD (*Least significant difference*) *post-hoc*, *One-way ANOVA* (*Analysis of variance*). A relevância da associação entre as variáveis foi estimada através do coeficiente de correlação de Pearson (P). As diferenças para valores de P menores que 0.05 ($P < 0.05$) foram consideradas estatisticamente significativas.

4. Conclusões.

4. Conclusões.

Este trabalho permitiu desenvolver e otimizar um processo de síntese da tioxantona TXA1, através de uma reacção de *N*-arilação, usando o cobre como catalisador e o K₂CO₃ como base. O processo desenvolvido permite a obtenção fácil e relativamente rápida desta tioxantona, com rendimentos da ordem de 50%. A partir da TXA1 obteve-se o respectivo cloridrato, TXA1.HCl, por reacção com HCl concentrado. Também aqui o processo é simples, eficaz e originou um produto com elevado grau de pureza, sem recorrer a processos de purificação muito trabalhosos ou elaborados. Ambas as substâncias sintetizadas (TXA1 e TXA1.HCl) foram caracterizadas e identificadas espectrometricamente por IV e ¹H RMN.

Foi também estudada a genotoxicidade da TXA1.HCl recorrendo ao ensaio *in vivo* do micronúcleo em murganhos. Os resultados obtidos permitiram verificar a capacidade da TXA1.HCl em induzir um aumento na frequência de eritrócitos micronucleados no sangue periférico de murganhos para doses iguais ou superiores a 25 mg/Kg.

Embora o modelo experimental do micronúcleo em murganhos seja um indicador importante de genotoxicidade, a sua confirmação será recomendável, através da realização de outros ensaios (como o teste de *Ames* ou estudos *in vivo*/*in vitro* de aberrações cromossomais em células na metafase). A realização do ensaio do micronúcleo noutros tecidos, nomeadamente na medula óssea, permitiria confirmar os resultados obtidos no sangue periférico. Como trabalho futuro poder-se-á também apontar a utilização da técnica de FISH, a qual possibilitaria esclarecer se a genotoxicidade da TXA1.HCl era devido a um efeito aneugénico ou clastogénico. Apesar dos resultados obtidos necessitarem de confirmação, estes poderão servir como orientação para as doses a serem utilizadas em ensaios *in vivo* a efectuar com este tipo de substâncias, nomeadamente em estudos de carcinogenicidade ou na avaliação da possível actividade anticancerígena.

5. Bibliografia.

5. Bibliografia.

- (1) PEDRAZA-CHAVERRI, J.; CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N.; OROZCO-IBARRA, M.; PÉREZ-ROJAS, J. M., *Medicinal properties of mangosteen (Garcinia mangostana)*, Food and Chemical Toxicology, **46**, (2008), 3227-3239.
- (2) LIU, Y.; ZOU, L.; MA, L.; CHEN, W.; WANG, B.; XU, Z., *Synthesis and pharmacological activities of xanthone derivates as α -glucosidase inhibitors*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, **14**, (2006), 5683-5690.
- (3) PINTO, M. M. M.; SOUSA, M. E.; NASCIMENTO, M. S. J., *Xanthonnes derivates: new insights in biological activities*, Current Medicinal Chemistry, **12**, (2005), 2517-2538.
- (4) CASTANHEIRO, R. A. P.; SILVA, A. M. S.; CAMPOS, N. A. N.; NASCIMENTO, M. S. J.; PINTO, M. M. M., *Antitumor activity of some prenylated xanthonnes*, Pharmaceuticals, **2**, (2009), 33-43.
- (5) LEIRO, J. M.; ALVAREZ, E.; ARRANZ, J. A.; SISO, I. G.; ORALLO, F., *In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta genes*, Biochemistry Pharmacology, **65**, (2003), 1361-1371.
- (6) JIANG, D. J.; JIANG, J. L.; TAN, G. S.; HUANG, Z. Z.; DENG, H. W.; LI, Y. J., *Demethylbellidifolin inhibits adhesion of monocytes to endothelial cells via reduction of endogenous nitric oxide synthase inhibitor level*, Planta Medica, **69**, (2003), 1150-1152.
- (7) NAKATAMI, K.; ATSUMI, M.; ARAKAWA, T., OOSAWA, K.; SHIMURA, S.; NAKAHATA, N.; OHIZUMI, Y., *Inhibition of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant*, Biological & Pharmaceutical Bulletin, **25**, (2002), 1137-1141.
- (8) JANG, D.; DAI, Z.; LI, Y., *Pharmacological and effects of xanthonnes as cardiovascular protective agents*, Cardiovascular Drug Reviews, **22**, (2004), 91-102.
- (9) LIN, C. N.; HSIEH, H. K.; LIOU, S. J.; KO, H. H.; LIN, H. C.; CHUNG, M. I.; KO, F. N.; LIU, H. W., TENG, C. M., *Synthesis and antithrombotic effect of xanthone derivates*, The Journal of pharmacy and pharmacology, **48**, (1996), 887-890.
- (10) JANTAN, I.; PISAR, M. M.; IDRIS, M. S.; TAHER, M.; ALI, R. M., *In vitro inhibitory effect of rubraxanthone isolated from Garcinia parvifolia on platelet-activating binding*, Planta Medica, **68**, (2002), 1133-1134.
- (11) JIANG, D. J.; JIANG, J. L.; TAN, G. S.; DU, H. Y.; XU, K. P.; LI, Y. J., *Protective effects of daviditin A against endothelial damage induced by lysophosphatidylcholine*, Naunyn Schmiedeberg's archives of Pharmacology, **367**, (2003), 600-606.
- (12) COOKE, J. P., *Does ADMA cause endothelial dysfunction?*, Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, **20**, (2000), 2032-2037.

- (13) JIANG, D. J.; HU, G. Y.; JIANG, J. L.; XIANG, H. L.; DENG, H. W.; LI, Y. J., *Relationship between protective effect of xanthone on endothelial cells and endogenous nitric oxide synthase inhibitors*, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **11**, (2003), 5171-5177.
- (14) WANG, H.; SHEN, R.; JIA, L.; WU, J.; TANG, N., *Cytotoxic activity and DNA-binding investigations of two benzoxanthone derivatives*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **57**, (2009), 808-813.
- (15) CAO, Z.; BAGULEY, B. C.; CHING, L. M.; *Interferon-inducible Protein 10 Induction and Inhibition of Angiogenesis in Vivo by the Antitumor Agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic Acid (DMXAA)*, *Cancer Research*, **61**, (2001), 1517-1521.
- (16) JAMESON, M. B.; THOMSON, P. I.; BAGULEY, B. C.; EVANS, B. D.; HARVEY V. J.; PORTER, D.J.; McCRYSTAL, M. R.; SMALL, M.; BELLENGER, K.; GUMBRELL, L.; HALBERT, G. W.; KESTELL, P., *Clinical aspects of a phase I trial of 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA), a novel antivasular agent*, *British Journal of Cancer*, **88**, (2003), 1844-1850.
- (17) HEALD, R. A.; DEXHAIMER, T. S.; VANKAYALAPATI, H.; SIDDIQUI-JAIN, A.; SZABO, L. Z.; GLEASON-GUZMAN, M. C.; HURLEY, L. H., *Conformationally restricted analogues of psorospermin: design, synthesis, and bioactivity of natural-product-related bisfuranoxanthenes*, *Journal of medicinal chemistry*, **48**, (2005), 2993-3004.
- (18) KWOK, Y.; HURLEY, L. H., *Topoisomerase II Site-directed Alkylation of DNA by Psorospermin and Its Effect on Topoisomerase II-mediated DNA Cleavage*, *Journal of the Biological Chemistry*, **95**, (1998), 33020-33026.
- (19) PERMANA, P. A.; HO, D. K.; CASSADY, J. M.; SNAPKA, R. M., *Mechanism of Action of the Antileukemic Xanthone Psorospermin: DNA Strand Breaks, Abasic Sites, and Protein-DNA Cross-Links*, *Cancer Research*, **54**, (1994), 3191-3195.
- (20) WOO, S.; KANG, D.; KIM, J.; LEE, C.; LEE, E.; JANHG, Y.; KWON, Y.; NA, Y., *Synthesis, cytotoxicity and topoisomerase II inhibition study of new thioxanthenes analogues*, *Bulletin of Korean Chemical Society*, **29**, (2008), 471-474.
- (21) HANSEN, M.; LEE, S.; CASSADY, J. M.; HURLEY, L. H., *Molecular details of the structure of a psorospermin- DNA covalent/intercalation complex and associated DNA sequence selectivity*, *Journal of American Chemical Society*, **118**, (1996), 5553-5561.
- (22) GUHA, S.; GHOSAL, S.; CHATTOPADHYAY, U., *Antitumor, Immunomodulatory and Anti-HIV Effect of Mangiferin, a Naturally Occurring Glucosylxanthone*, *International Journal of Experimental and Clinical Chemotherapy*, **42**, (1996), 443-451.

5. Bibliografia.

- (23) PENG, Z. G.; LUO, J.; XIA, L. H.; CHEN, Y.; SONG, S. J., *CML cell line K562 cell apoptosis induced by mangiferin*, *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, **12**, (2004), 590-594.
- (24) AKAO, Y.; NAKAGAWA, Y.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y., *Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen*, *International Journal of Molecular Sciences*, **9**, (2008), 355-370.
- (25) http://megafood.info/mangosteen_properties.htm (accedido a 19/09/2010).
- (26) MATSUMOTO, K.; AKAO, Y.; KOBAYASHI, E.; OHGUCHI, K.; ITO, T.; TANAKA, T.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y., *Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines*, *Journal of Natural Products*, **66**, (2003), 1124-1127.
- (27) HO, C. K.; HUANG, Y. L.; CHEN, C. C., *Garcinone E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines*, *Planta Medica*, **68**, (2002), 975-979.
- (28) MOONKARNDI, P.; KOSEM, N.; KASLUNGKA, S.; LUARATANA, O.; PONGPAN, N.; NEUNGTON, N., *Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line*, *Journal of Ethnopharmacology*, **90**, (2004), 161-166.
- (29) NABANDITH, V.; SUZUI, M.; MORIOKA, T.; KANESHIRO, T.; KINJO, T.; MATSUMOTO, K.; AKAO, Y.; IINUMA, M.; YOSHIMI, N., *Inhibitory effects of crude alpha-mangostin, a xanthone derivative, on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in the rat*, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **5**, (2004), 433-438.
- (30) DASSONNEVILLE, L.; BAILY, C., *Stimulation of topoisomerase II mediated DNA cleavage by an indazole analogue of lucanthone*, *Biochemical Pharmacology*, **58**, (1999), 1307-1312.
- (31) ZHAO, J.; LAROCK, R. C., *Synthesis of xanthenes, thioxanthenes and acridones by the coupling of arynes and substituted benzoates*, *Journal of Organic Chemistry*, **72**, (2007), 583-588.
- (32) CIOLI, D.; PICA-MATTOCIA, L.; ARCHER, S., *Antischistosomal drugs: Past, present... and future?*, *Pharmacology & Therapeutics*, **68**, (1995), 46-51.
- (33) ROSI, D.; PERUZZOTTI, G.; DENNIS, E. W.; BERBERIAN, D. A.; FREELE, H.; ARCHER, S.; *A new, active metabolite of Miracil D*, *Nature*, **208** (1965), 1005-1006.
- (34) DAVIS, A.; JORDAN, P.; WEEBE, G., *Management of the patient with schistosomiasis*, *Schistosomiasis: Epidemiology, treatment and control*- Heinemann Medical Books, (1982), 184-226.

- (35) HELLER, M. J.; TU, A. T., MACIEL, G. E., *Interaction of Miracil D with double-stranded poly (adenylic acid) poly (uridylic acid)*, *Biochemistry*, **13**, (1974), 1623-1631.
- (36) HORWITZ, J. P.; MASSOVA, I.; WIESSE, T. E.; BESLER, B. H.; CORBETT, T. H., *Comparative molecular field analysis of the antitumor activity of 9H-thioxanten-9-one derivatives against pancreatic ductal carcinoma 03*, *Journal of medicinal chemistry*, **37**, (1994), 781-786.
- (37) CLIVE, D.; FLAMM, W. G.; MACHESKO, R., *Mutagenicity of hycanthone in mammalian cells*, *Mutagenicity Research*, **14**, (1972), 262-264.
- (38) HETRICK, F. M.; KOS, W. L., *Transformation of Rauscher virus-infected cells cultures after treatment with hycanthone and lucanthone*, *Journal of Pharmacological Experimental Therapy*, **186**, (1973), 425-429.
- (39) BASES, R. E.; MENDEZ, M. D. F., *Topoisomerase inhibition by lucanthone, an adjuvant in radiation therapy*, *International Journal of Radiation, Oncology, Biology, Physics*, **37**, (1997), 1133-1137.
- (40) FORTUNE, J. M.; OSHEROFF, N., *Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: When enzymes stop being nice*, *Progress in nucleic acid research molecular biology*, **64**, (2000), 221-253.
- (41) VEAL, G. J.; ERRINGTON, J.; SLUDDEN, J.; GRIFFIN, M. J.; PRICE, L.; PARRY, A.; HALE, J., *Determination of anti-cancer drug actinomycin D in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry*, *Journal of Chromatography B*, **795**, (2003), 237-243.
- (42) COOK, T. M.; GOLDMAN, C. K., *Hycanthone and its congeners as bacterial mutagens*, *Journal of Bacteriology*, **122**, (1975), 549-555.
- (43) SIEBER, S. M.; WHANG-PENG, J.; ADAMSON, R. H., *Teratogenic and cytogenic effects of hycanthone in mice and rabbits*, *Teratology*, **10**, (1974), 227-236.
- (44) ONG, T., *Genetic activities of hycanthone and some other antischistosomal drugs*, *Mutation Research*, **55**, (1978), 43-70.
- (45) http://www.genetichealth.com/g101_changes_in_dna.shtml (accedido a 03/06/10).
- (46) HARTMAN, P. E., BERGER, H.; HARTMAN, Z., *Comparasion of hycanthone ("Etrenol") some hycanthone analogs, myxin and 4-nitroquinoline-1-oxide as frameshift mutagens*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **186**, (1973), 390-398.
- (47) ESPINOSA, E.; ZAMORA, P.; FELIU, J.; BARÓN, M. G., *Classification of anti-cancer drugs-a new system based on therapeutics targets*, **29**, (2003), 515-523.
- (48) LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G., *Molecular mechanism of drug resistance*, *The journal of pathology*, **205**, (2005), 275-292.

5. Bibliografia.

- (49) ZHOU, B. B.; BARTEK, J., *Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection*, *Nature review- cancer*, **4**, (2004), 216-225.
- (50) DEL ROWE, J. D.; BELLO, J.; MITNICK, R.; SOOD, B.; FILIPPI, C.; MORAN, J.; FREEMAN, K.; MENDEZ, F.; BASES, R., *Accelerated regression of brain metastases in patients receiving whole brain radiation and the topoisomerase II inhibitor, lucanthone*, *International Journal of Radiation, Oncology, Biology, Physics*, **43**, (1999), 89-93.
- (51) KINGMA, P. S.; CORBETT, A. H.; BURCHAM, P. C.; MARNET, L. J.; OSHEROFF, N., *Abasic sites stimulate double-stranded DNA cleavage mediated by topoisomerase II poisons*, *Journal of biological chemistry*, **270**, (1995), 21441-21444.
- (52) <http://ocw.jhsph.edu/imageLibrary/index.cfm/go/il.viewImageDetails/resourceID/98B6BACF-9510-F180-5D631432CD9CC7C9> (accedido a 20/06/2010).
- (53) MENDEZ, F.; GOLDMAN, J. D.; BASES, R. E., *Abasic sites in DNA of HeLa cells induced by lucanthone*, *Cancer Investigation*, **20**, (2002), 983-991.
- (54) HELLEDAY, T.; PETERMANN, E.; LUNDIN, C.; HODGSON, B.; SHARMA, R. A., *DNA repair pathways as targets for cancer therapy*, *Nature review cancer*, **8**, (2008), 193-204.
- (55) BADAWI, A. F.; MOSTAFA, M. H.; ABOUL-AZM, T.; HABOUBI, N. Y.; O'CONNOR, P. J.; COOPER, D. P., *Promutagenic methylation damage in bladder DNA from patients with bladder cancer associated with schistosomiasis and from normal individuals*, *Carcinogenesis*, **13**, (1992), 871-888.
- (56) BADAWI, A. F.; MOSTAFA, M. H., *Possible mechanisms of alteration in the capacities of carcinogen metabolizing enzymes during schistosomiasis and their role in bladder cancer induction*, *Journal of International Medicinal Research*, **21**, (1993), 281-305.
- (57) BADAWI, A. F., *O⁶- Methylguanine and O⁶-methylguanine-dna-methyltransferase activity in tissues of BDF-1 mice treated with antiparasitic drugs*, *Toxicology Letters*, **94**, (1998), 199-208.
- (58) KOSTAKIS, I. K.; POULI, N.; MARAKOS, P.; MIKROS, E.; SKALTSOUNIS, A.; LEONCE, S.; ATASSI, G.; RENARD, P., *Synthesis, cytotoxic activity, NMR study and stereochemical effect of some new pyrano [3,2-b]thioxanthen-6-ones and pyrano [2,3-c]thioxanthen-7-ones*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **9**, (2001), 2793-2802.
- (59) MICHEL, S.; GASLONDE, T.; TILLEQUIN, F., *Benzo[b]acronycine derivatives: a novel class of antitumor agents*, *European Journal of Medical Chemistry*, **39**, (2004), 649-655.

- (60) DORR, R. T.; LIDDIL, J. D.; VON HOFF, D. D.; SOBLE, M.; OSBORNE, C. K., *Antitumor activity and murine pharmacokinetics of parental acronycine*, *Cancer Research*, **49**, (1989), 340-344.
- (61) KOSTAKIS, I. K.; GHIRTIS, K.; POULI, N.; MARAKOS, P.; SKALTSOUNIS, A.; LEONCE, S.; CAIGNARD, D.; ATASSI, G.; *Synthesis and cytotoxic activity of 2-dialkylaminoethylamino substituted xanthenone and thioxanthenone derivatives*, *Il Farmaco*, **55**, (2000), 455-460.
- (62) CORBETT, T. H.; PANCHAPOR, C.; POLIN, L.; LOWICHIK, N.; PUGH, S.; WHITE, K.; KUSHNER, J.; MEYER, J.; CZARNECKI, S.; EDELSTEIN, M.; LORUSSO, P.; HEILBURN, L.; HORWITZ, J. P.; GRIESHABER, C.; PERNI, R.; WENTLAND, M.; COUGHLIN, S.; ELENBASS, S.; PHILION, R.; RAKE, J., *Preclinical efficacy of thioxanthone SR271425 against transplanted solid tumors of mouse and human origin*, *Investigational New Drugs*, **17**, (1999), 17-27.
- (63) CORBETT, T.; LOWICHIK, N.; PUGH, S.; POLIN, L.; PANCHAPOR, C.; WHITE, K.; DEMCHIK, L.; JONES, J.; JONES, L.; KNIGHT, J.; BIERNAT, L.; LORUSSO, P.; FOSTER, B.; HEILBURN, L.; RAKE, J.; MATTES, K. C.; PERNI, R.; POWLES, R. G.; HLAVAC, A. G.; WENTLAND, M. K.; COUGHLIN, S.; BAKER, L.; VALERIOTE, F.; *Antitumor activity of Antitumor activity of N-[[1-[[2-(diethylamino)ethyl]amino]-9-oxo-9H-thioxanthen-4-yl]methyl]methanesulfonamide (WIN33377) and analogs*, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **3**, (1994), 1281-1292.
- (64) LORUSSO, P. M.; FOSTER, B. J.; WOZNIAK, A.; HEILBURN, L. K.; McCORMICK, J. I.; RUBLE, P. E.; GRAHAM, M. A.; PURVIS, J.; RAKE, J.; DROZD, M.; LOCKWOOD, G. F.; CORBETT, T. H., *Phase I Pharmacokinetic study of the Novel Antitumor agent SR233377*, *Clinical cancer research*, **6**, (2000), 3088-3094.
- (65) GONÇALVES, P. H.; HIGH, F.; JUNIEWICZ, P.; SHACIDETON, G.; LI, J.; BOERNER, S.; LORUSSO, P. M.; *Phase I dose-escalation study of thioxanthone SR271425 administered intravenously once every 3 weeks in patients with advanced malignancies*, *Investigational New Drugs*, **26**, (2008), 347-352.
- (66) IZBICKA, E.; LAWRENCE, R.; DAVIDSON, K.; RAKE, J. B.; VON HOFF, D. D., *Effects of SW33377, SW68210 and SW71425 thioxanthenes on in vitro colony formation of freshly explanted human tumor cells*, *Investigational New Drugs*, **16**, (1999), 221-225.
- (67) WADKINS, R.; *Report on file: characterization of the interaction of SR271425 with topoisomerase I and II*, *CTRC Institute of drug development San Antonio*, (1999).
- (68) LUN, L.; SUN, P. M.; TRUBEY, C. M.; BACHUR, N. R., *Antihelicase action of CI-958 a new drug for prostate cancer*, *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, **42**, (1998), 447-453.

5. Bibliografia.

- (69) http://www.innovation.org/drug_discovery/objects/pdf/RD_Brochure.pdf (acedido a 27/06/10).
- (70) http://www.ppd.com/about_ppd/drug_development.htm# (acedido a 27/06/10).
- (71) CASKEY, C.T., *The drug development crisis: efficiency and safety*, Annual review of Medicine, **58**, (2007), 1-16.
- (72) SMITH, C., *Hitting the target*, Nature, **422**, (2003), 341-347.
- (73) http://pharmalicensing.com/public/articles/view/1005568086_3befc0562a952 (acedido a 27/06/10).
- (74) http://netdrive.montclair.edu/~olsenk/robot_files/image006.jpg (acedido a 14/08/2010).
- (75) MUSTER, W.; BREIDENBACH, A.; FISCHER, H.; KIRCHNER, S.; MULLER, L.; PAHLER, A., *Computational toxicology in drug development*, Drug Discovery Today, vol. 13, nº7/8, (2008), 303-310.
- (76) PATRICK, G.L., *Drug design: optimizing target interactions*. Em: PATRICK, G.L., *An introduction to medicinal chemistry*, Oxford University Press, Nova Iorque, 3ª Edição, (2005), 186-218.
- (77) PATRICK, G.L., *Drug design: optimizing access to the target*. Em: PATRICK, G.L., *An introduction to medicinal chemistry*, Oxford University Press, Nova Iorque, 3ª Edição, (2005), 226-235.
- (78) NASSAR, A.F.; KAMEL, A.M.; CLARIMONT, C., *Improving the decision-making process in structural modification of drug candidates: reducing toxicity*, Drug Discovery Today, vol.9, nº24, (2004), 1055-1062.
- (79) BAXTER, A. D.; LOCKEY, P. M., "Hit" to "lead" and "lead" to candidate optimization using multi-parametric principles, Drug Discovery World, **2**, (2001), 9-15.
- (80) PATRICK, G.L., *An introduction to medicinal chemistry*, Oxford University Press, Nova Iorque, 3ª Edição, (2005), 162-173, 198-201.
- (81) DAMIA, G.; D'INCALCI, M., *Contemporary pre-clinical developments of anticancer agents-What are the optimal preclinical models?*, European Journal of Cancer, **45**, (2009), 2768-2781.
- (82) BASS, A.S.; CARTWRIGHT, M.E.; MAHON, C.; MORRISON, R.; SNYDER, R.; McNAMARA, P.; BRADLEY, P.; ZHOU, Y.; HUNTER, J., *Exploratory drug safety: A discovery strategy to reduce attrition in development*, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, (2009), doi:10.1016/j.vascn.2009.04.194.
- (83) ULRICH, R.; FRIEND, S. H., *Toxicogenomics and drug discovery: will new technologies help us produce better drugs?*, Nature reviews, vol.1, (2002), 84-88.
- (84) HEFTI, F.F.; *Requirements for a lead compound to become a clinical candidate*, BMC Neuroscience, vol. 9, sup. 3, (2008).

- (85) LING, J.; SAHAKIAN, D.C.; DE MORAIS, S.M.F.; XU, J.J.; POLZER, R.J.; WINTER, S.M., *The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery*, Current topics in Medicinal Chemistry, vol. 3, (2003), 1125-1154.
- (86) KRAMER, J.A.; SAGARTZ, J.E.; MORRIS, D.L., *The application of discovery toxicology and pathology toward the design of safer pharmaceutical lead candidates*, Nature Reviews, vol. 6, (2007), 636-649.
- (87) SNYDER, R.D.; SMITH, M.D., *Computational prediction of genotoxicity: room of improvement*, Drug Discovery Today, vol. 10, n°16, (2005), 1119-1124.
- (88) WALKER, D.K., *The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in the assessment of drug safety in early drug development*, British Journal of Clinical Pharmacology, vol. 56, n°6, 601-608.
- (89) STEVENS, J. L.; BAKER, T. K., *The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus*, Drug Discovery Today, vol.14, n°3/4, (2009), 162-167.
- (90) ICH Guideline, (M3r1), *Maintenance of the ICH Guidelines on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals*, (2000).
- (91) GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G., *Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective*, Mutation Research, vol. 455, (2000), 21-28.
- (92) <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html> (acedido a 04/07/10).
- (93) WALLUN, E., *Acute Oral Toxicity*, Environmental Health Perspectives, vol. 106, sup.2, (1998), 497-503.
- (94) WILLIAMS, P.L.; JAMES, R.C.; ROBERTS, S.M., *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*, John Wiley & Sons inc., Canada, (2000), 163-173, 198-201, 250-265.
- (95) ICH Guideline (S3A), *The assessment of systemic exposure in toxicity studies*, (1994).
- (96) ICH Guideline (S5r2), *Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility*, (1993).
- (97) ICH Guideline (S2A), *Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals*, (1995).
- (98) ICH Guideline (S2B), *Genotoxicity: a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals*, (1997).
- (99) ICH Guideline (S1A), *Guideline on the need for carcinogenicity studies for pharmaceuticals*, (1995).
- (100) ICH Guideline (S1B), *Testing for carcinogenicity of pharmaceuticals*, (1997).
- (101) STEVENS, J. L.; BAKER, T. K., *The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus*, Drug Discovery Today, vol.14, n°3/4, (2009), 162-167.
- (102) ICH Guideline (S7A), *Safety studies for human pharmaceuticals*, (2000).

5. Bibliografía.

- (103) GARCIA-SAGREDO, J. M., *Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1779**, (2008), 363-375.
- (104) KIRKLAND, D. J., *Basic mutagenicity tests*, United Kingdom Environmental Mutagen Society, (1990), Reino Unido, 1ª Edición, (1990), 115-137.
- (105) FENECH, M., *The in vitro micronucleus technique*, *Mutation Research*, **455**, (2000), 81-95.
- (106) http://www.rerf.or.jp/radefx/late_e/chromoab.html (accedido a 11/07/2010).
- (107) FENECH, M., *Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death*, *Mutation Research*, **600**, (2006), 58-66.
- (108) ZALACAIN, M.; SIERRASESÚMAGA, L.; PATIÑO, A., *El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos*, *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, **28**, (2005), 227-236.
- (109) http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/AF/Artifacts/body_Artifacts_il9.htm (accedido a 11/07/10).
- (110) IAMARCOVAI, G.; CEPPI, M.; BOTTA, A.; BONASSI, S., *Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis*, *Mutation Research*, **659**, (2008), 274-283.
- (111) RASGELE, P. G.; KAYMAK, F., *Chromosome aberration, micronucleus and sperm head abnormalities in mice treated with Delvocid, a food preservative*, *Food and Chemical Toxicology*, **48**, (2010), 789-797.
- (112) HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; ADLER, I.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S., *In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**, (2000), 234-252.
- (113) MOORE, F. R.; URDA, G. A.; KRISHNA, G.; THEISS, J. C., *An in vivo/in vitro method for assessing micronucleus and chromosome aberration induction in rat bone marrow and spleen 1. Studies with cyclophosphamide*, *Mutation Research*, **335**, (1995), 191-199.
- (114) VAN MIERT, E.; VANSCHEEUWIJCK, P.; MEURRENS, K.; GOMM, W.; TERPSTRA, P., *Evaluation of the micronucleus assay in bone marrow and peripheral blood of rats for the determination of cigarette mainstream-smoke activity*, *Mutation Research*, **652**, (2008), 131-138.
- (115) HAYASHI, M.; *Three Rs in mutation research- From in vivo to in silico evaluation*, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, **14**, (2007), 9-13.

- (116) RAMÍREZ-MUÑOZ, M. P.; ZÚÑIGA, G.; TORRES-BUGARÍN, O.; PORTILLA, E.; GARCÍA-MARTINEZ, D.; RAMOS, A.; CANTÚ, J. M.; SÁNCHEZ-CORONA, J., *Evaluation of the micronucleus test in peripheral blood erythrocytes by use of the splenectomized model*, Laboratory Animal Science, **49**, (1999), 418-420.
- (117) KRISHNA, G.; URDA, G.; PAULISSEN, J., *Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats*, Mutation Research, **453**, (2000), 45-50.
- (118) <http://genpharmtox.de/downloads/AssaySheetMikronucleusAssay.pdf> (accedido a 11/07/10).
- (119) WINEGAR, R.; *Evaluation od Trehalose in the mouse micronucleus assay*, SRI International Study N^o, G019-97, (1997), 1-15.
- (120) KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M., *Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes*, Mutagenesis, **16**, (2001), 51-58.
- (121) VIJAYALAXMI; KLIGERMAN, A. D.; PRIHODA, T. J.; ULRICH, S. E., *Micronucleus studies in the peripheral blood and bone marrow of mice treated with jet fuels, JP-8 and Jet-A*, Mutation Research, **608**, (2006), 82-87.
- (122) MURGIA, E.; BALLARDIN, M.; BONASSI, S.; ROSSI, A. M.; BARALE, R., *Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study*, Mutation Research, **639**, (2008), 27-34.
- (123) http://www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm (accedido a 11/07/10).
- (124) LEWINSKA, D.; STEPNIK, M.; KRAJEWISK, W.; ARKUSZ, J.; STANCYZK, M.; WRONSKA-NOFER, T., *Increased incidence of micronuclei assessed with the micronucleus assay and the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique in peripheral blood lymphocytes of nurses exposed to nitrous oxide*, Mutation Research, **581**, (2005), 1-9.
- (125) CAVALLO, D.; URSINI, C. L.; OMODEO-SALÈ, E.; IAVICOLI, S., *Micronucleus induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses administering antineoplastic drugs*, Mutation Research, **628**, (2007), 11-18.
- (126) HAYASHI, M; MACGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; ASANO, N.; SUZUKI, H.; OHYAMA, W.; GIBSON, D., *In vivo t erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hemopoietic target cells and a single dose-level limit test*, Mutation Research, **627**, (2007), 10-30.

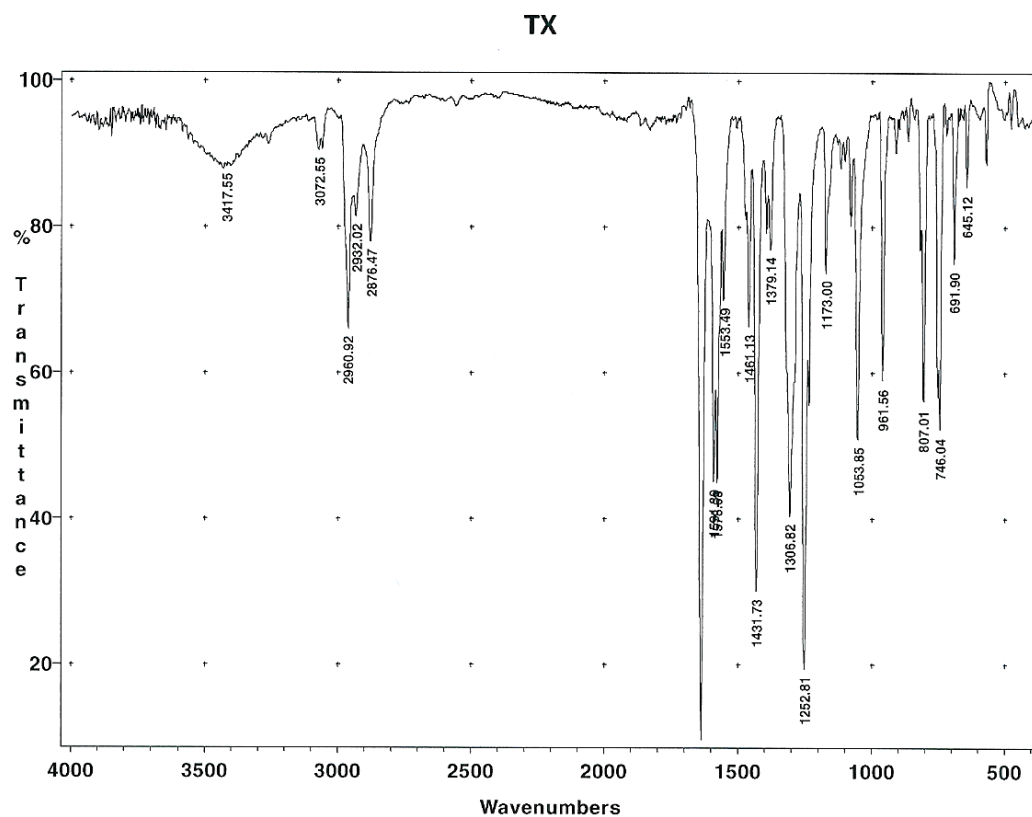
5. Bibliografia.

- (127) http://www.tissuegnostics.com/img/hemoquest/hq_micro_display.jpg (acedido a 11/07/10).
- (128) FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E., *HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*, Mutation Research, **534**, (2003), 65-75.
- (129) <http://www.abcam.com/ps/CMS/Images/Flow-Cytometry-Diagram2.jp> (acedido a 11/10/07).
- (130) <http://www.mspscorp.com/images/products/F> (acedido a 11/10/07).
- (131) MACGREGOR, J. T.; BISHOP, M. E.; MCNAMEE, J. P.; HAYASHI, M.; ASANO, N.; WAKATA, A.; NAKAJIMA, M.; SAITO, J.; AIDOO, A.; MOORE, M. M.; DERTINGER, S. D., *Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat*, Toxicological Sciences, **94**, (2006), 92-107.
- (132) LIMA, J.; SOUSA, E.; NAZARETH, N.; SECA, H.; LIMA, R.; VASCONCELOS, M. H.; NASCIMENTO, M. S. J.; PINTO, M., *Parallel synthesis of xanthone derivatives for dual activity: antitumour activity and P-Glycoprotein inhibition*, Revista Portuguesa de Farmácia, **154**, (2008), 106.
- (133) PORTELA, C. AFONSO, C. M.; PINTO, M. M.; LOPES, D.; NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V., *Synthesis and antimalarial properties of new chloro-9H-xanthenes with na aminoalkyl side chain*, Chemical Biodiversity, **4**, (2007), 1508-1519.
- (134) LANG, F.; ZEUGE, D.; HOUPIS, I. N.; VOLANTE, R. P., *Amination of aryl halides using copper catalysis*, Tetrahedon Letters, **42**, (2001), 3521-3524.
- (135) McMURRY, J; Organic Chemistry, Brooks/Cole- Thompson Learning, Belmont-EUA, 7ª Edição, (2008), 547-598.
- (136) BELETSKAYA, I. P.; CHEPRAKOV, A. V.; *Copper in cross-coupling reactions: the post-Ullmann chemistry*, Coordination Chemistry Reviews, **248**, (2004), 2337-2364.
- (137) VAN-ALLEN, D., *Methodology and mechanism: Reinvestigating the Ullmann reaction*, Doctor of Philosophy Theses, Graduate School, Universidade de Massachusetts Amherst, Massachusetts, (2004).
- (138) GOMES, A. S.; VIEIRA, D.; PALMEIRA, A.; AFONSO, C.; SOUSA, M. E.; PINTO, M., *Synthesis of xanthone derivates with a promising antifungal activity*, IJUP10- 3º Encontro de Jovens Investigadores da Universidade do Porto, Reitoria, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 17-19 de Fevereiro de 2010, 296.
- (139) YOO, S. H., *Amine acid salt compounds and process for the production thereof*, US Patent 5686588, 11 de Novembro de 1997.

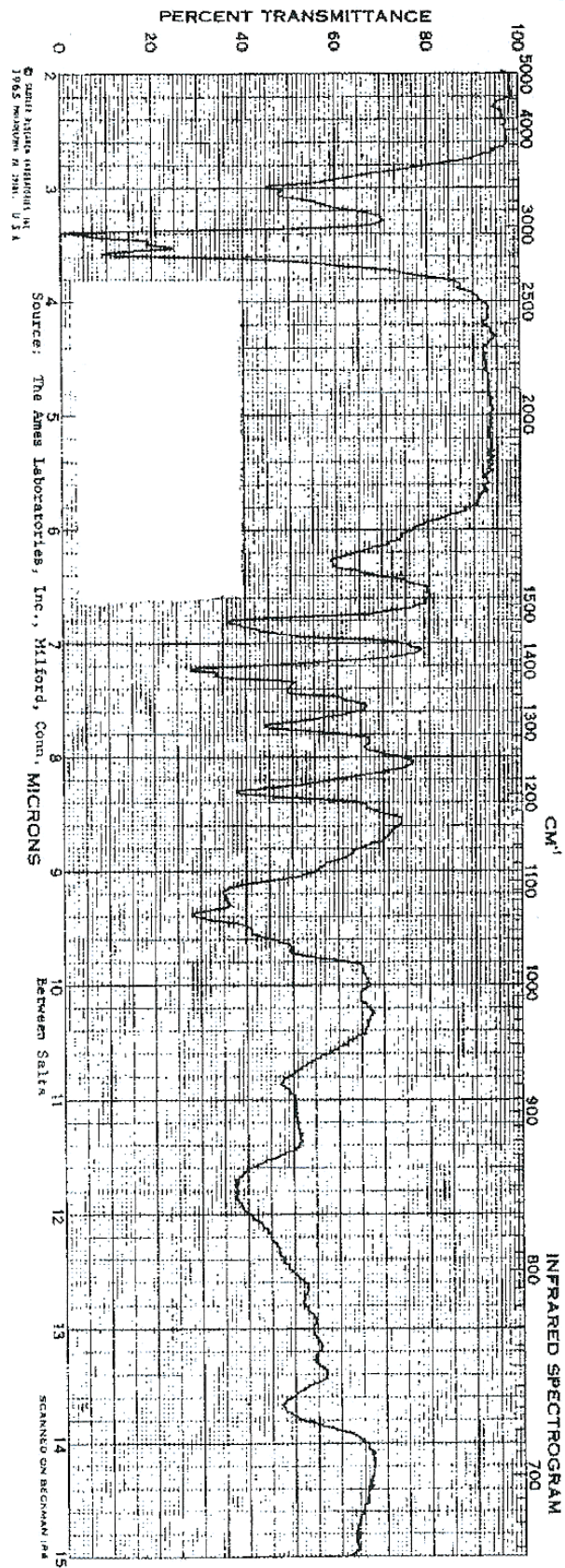
- (140) HEACOCK, R. A.; MARION, L., The infrared spectra of secondary amines and their salts, *Canadian Journal of Chemistry*, **34**, 1956, 1782-1795.
- (141) DACIE, J. V., LEWIS, S. M., *Practical Haematology*, Churchill Livingstone, Edinburgo, Escócia, 5^a Edição, (1975), 604.

Anexos

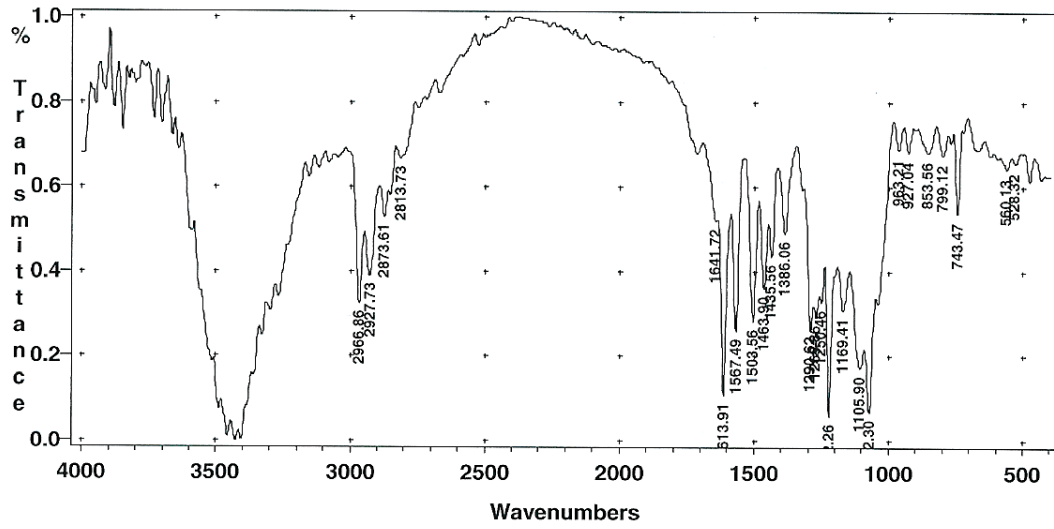
Anexo I- Espectros de IV da TX, A1, TXA1 e TXA1. HCl.



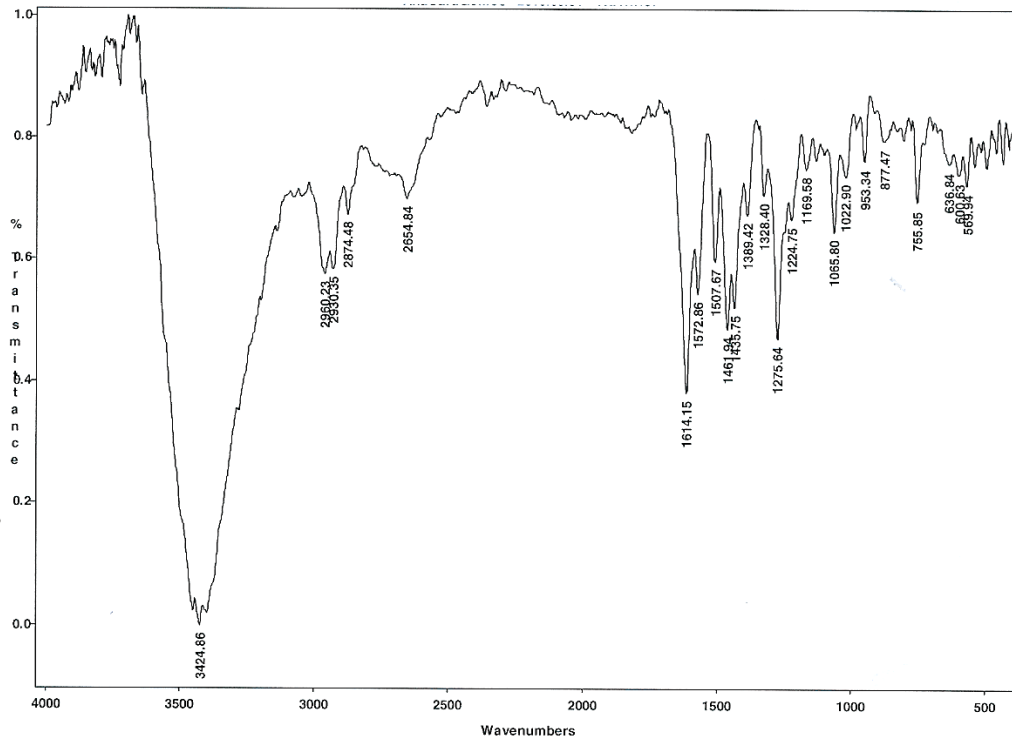
A1



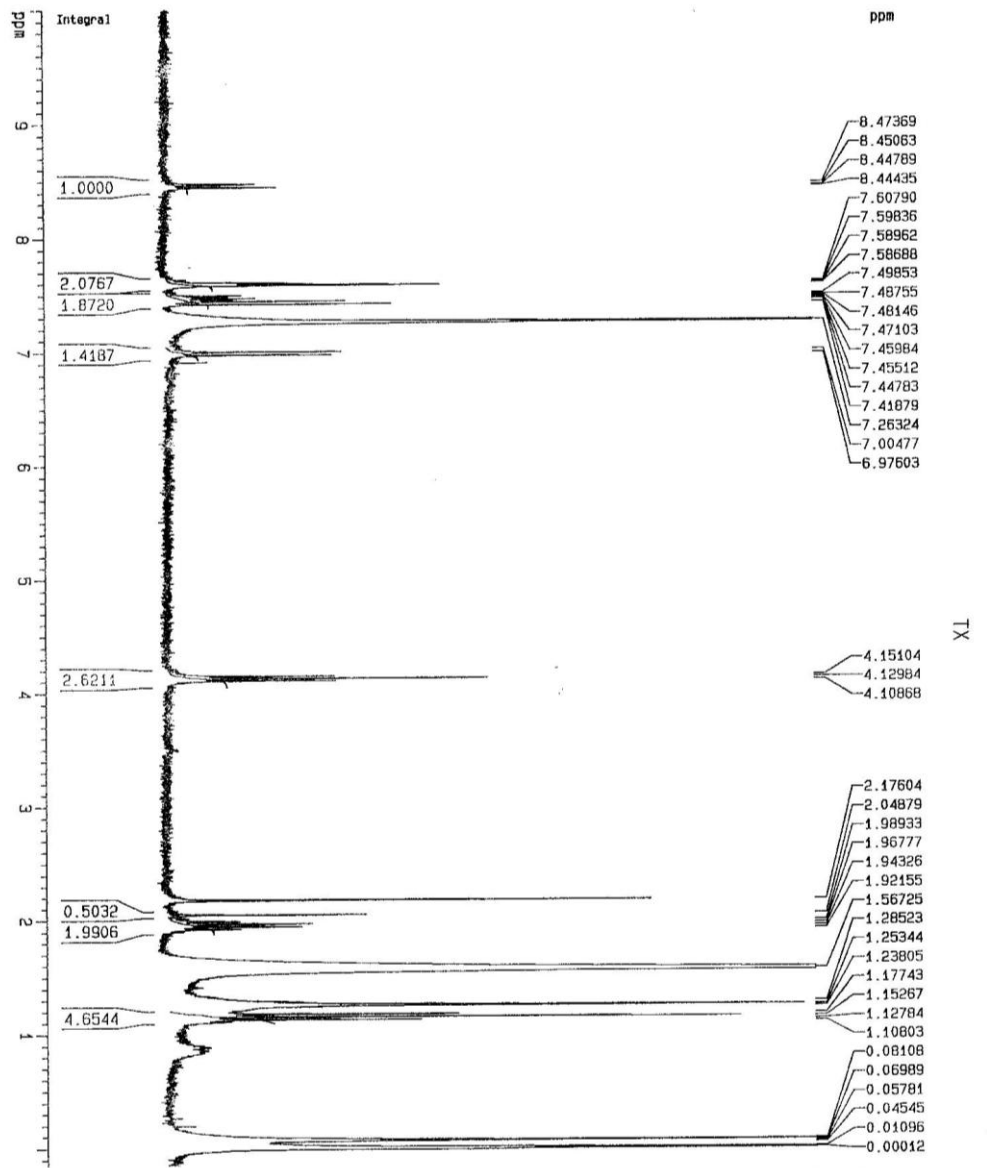
TXA1



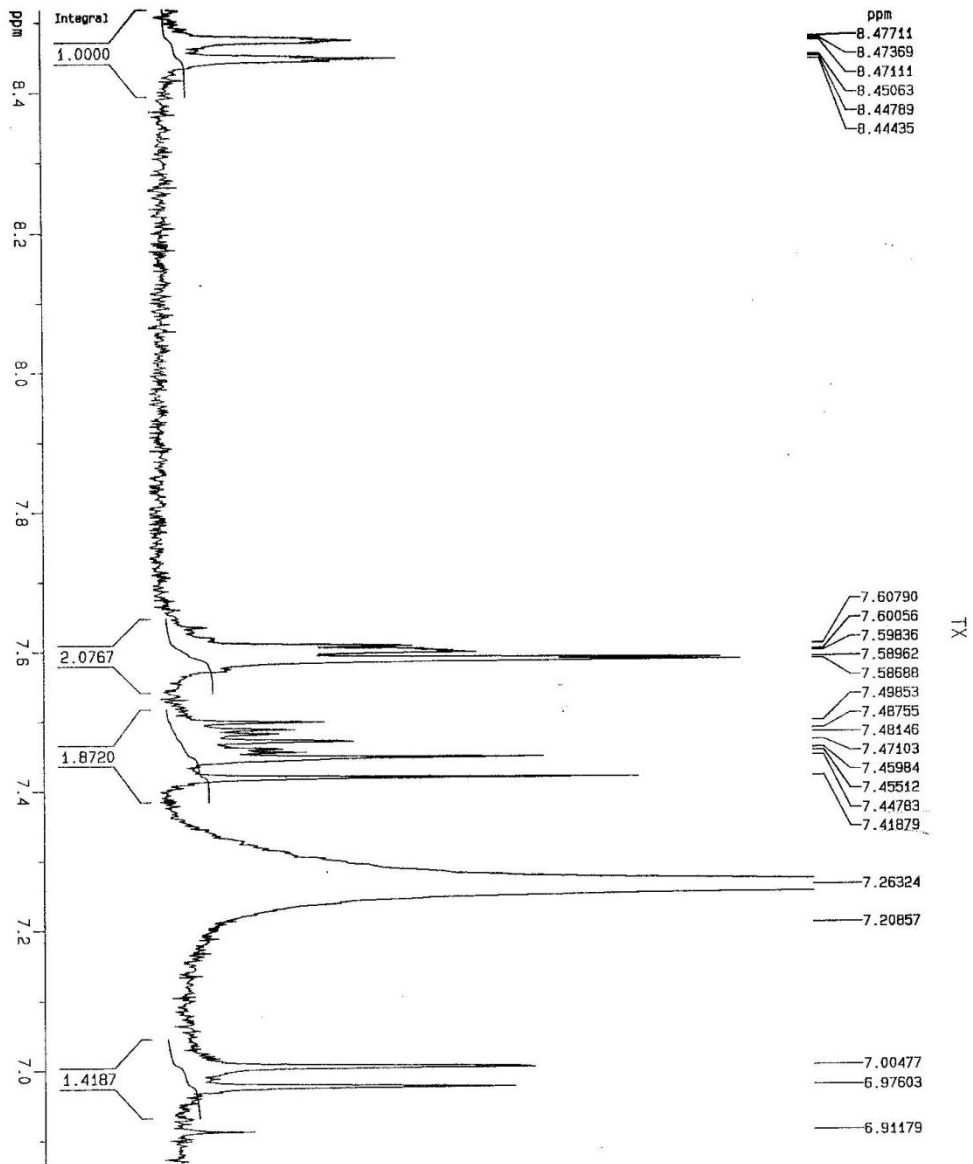
TXA1.HCl



Anexo II- Espectros de ^1H RNM da TX, TXA1 e TXA1. HCl.

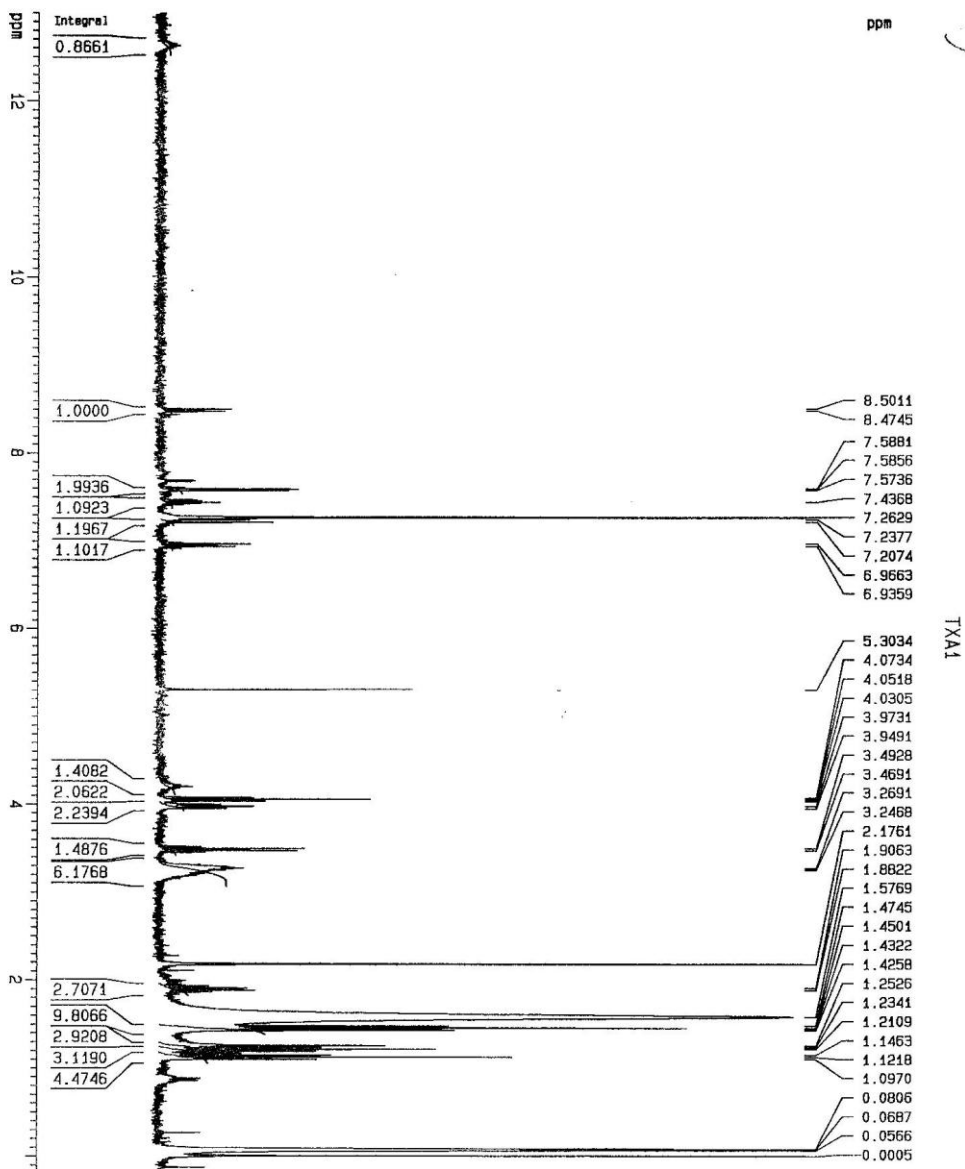


Current Data Parameters
 NAME q2008-39
 EXPNO 28
 PROCNO 1
 Date_ 20080721
 RG 2298.8
 NUC1 1H
 SF01 300.1320000 MHz



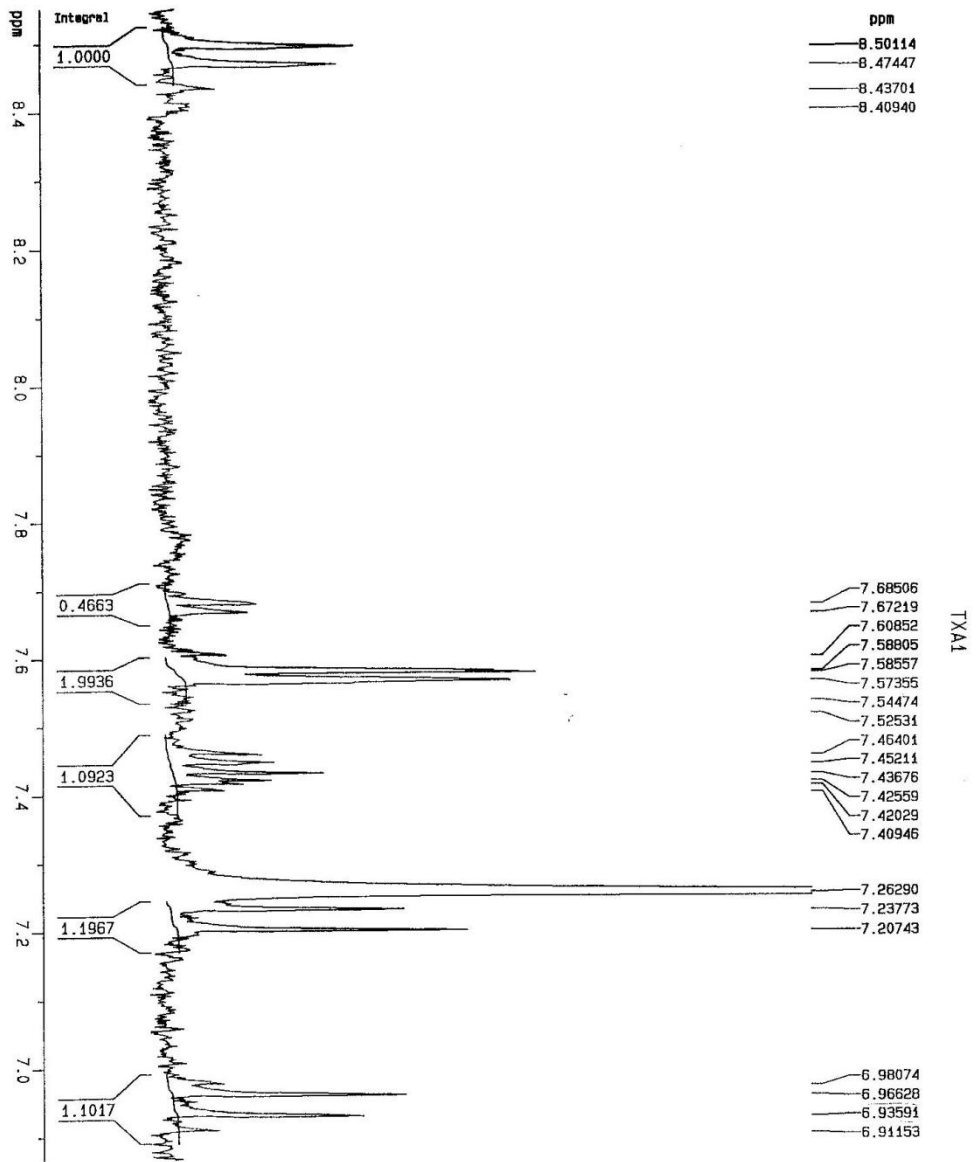
Current Data Parameters

NAME	q2008-39
EXPNO	29
PROCNO	1
Date_	20080721
RG	2298.8
NUC1	1H
SF01	300.1320000 MHz

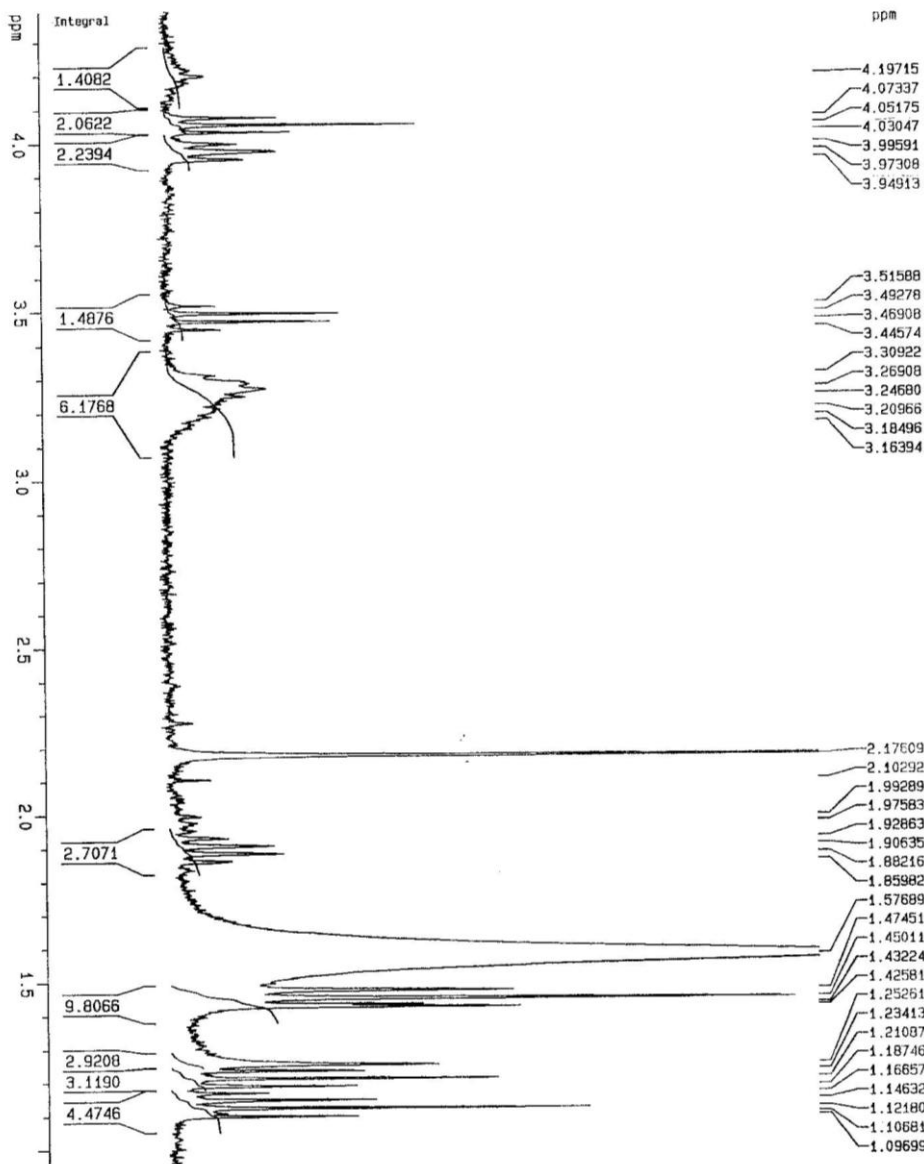


Current Data Parameters

NAME	q2009-15
EXPNO	50
PROCNO	1
Date_	20090326
RG	2048
NUC1	1H
SFO1	300.132000 MHz

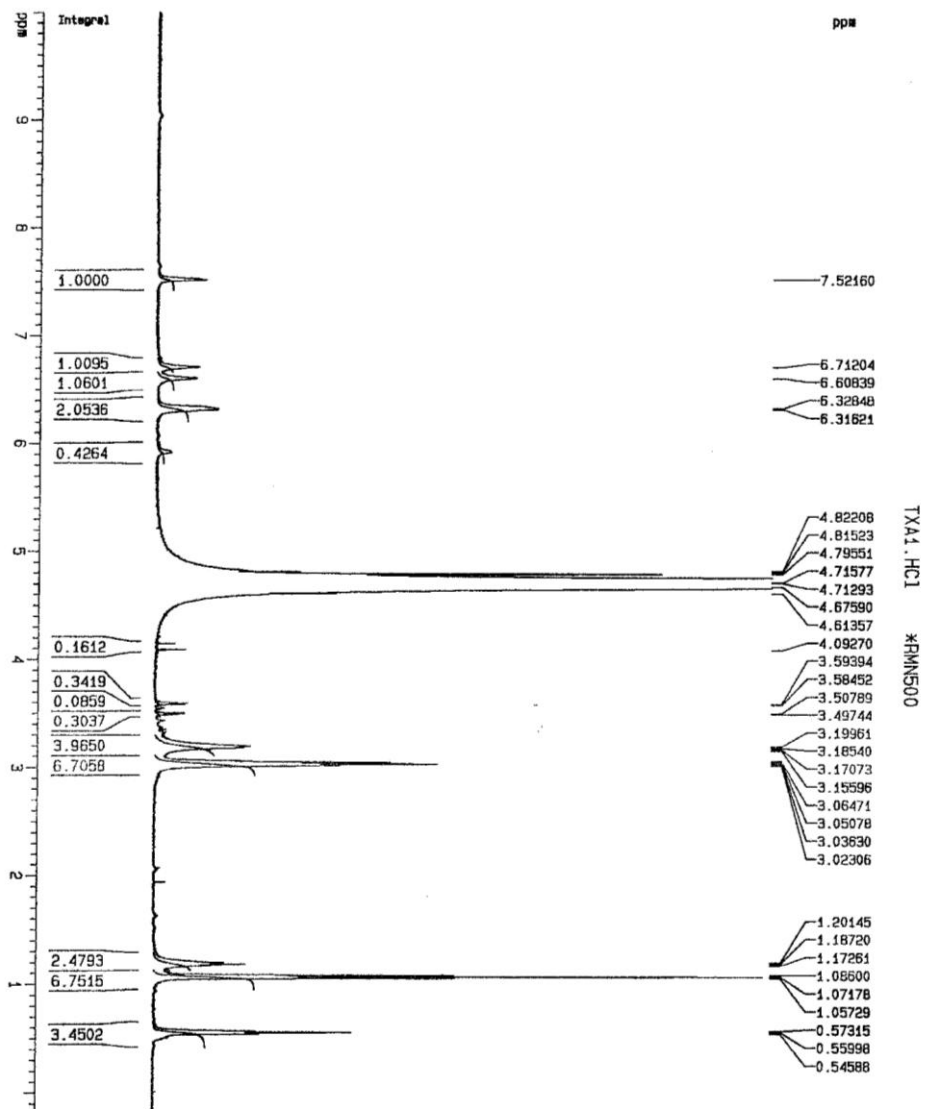


Current Data Parameters
 NAME q2009-15
 EXPNO 50
 PROCNO 1
 Date_ 20090326
 RG 2048
 NUC1 1H
 SF01 300.1320000 MHz

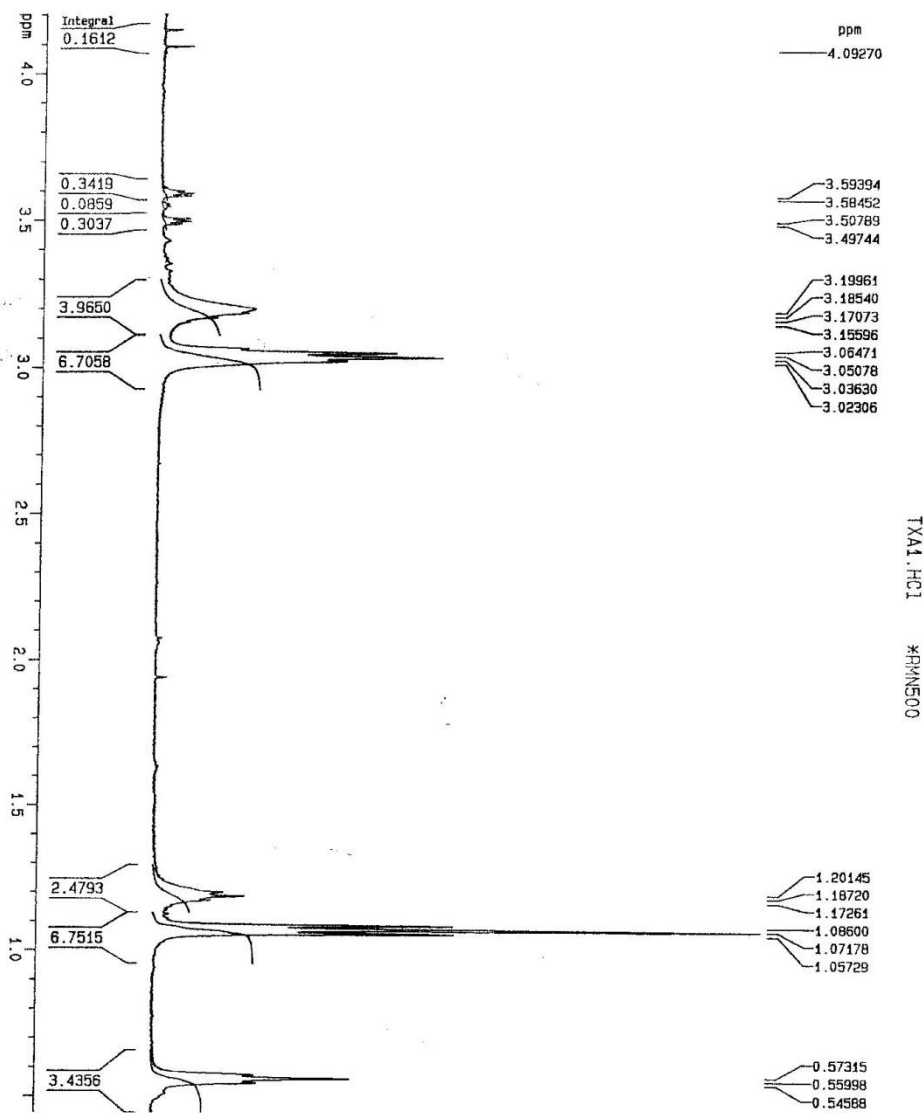


TXA1

Current Data Parameters
 NAME q2009-15
 EXPNO 50
 PROCNO 1
 Date_ 20090326
 RG 2048
 NUC1 1H
 SFO1 300.1320000 MHz



Current Data Parameters
 NAME q2010-37
 EXPNO 03
 PROCNO 1
 Date_ 20100609
 RG 5
 NUC1 1H
 SF01 500.1332750 MHz



Current Data Parameters

NAME	q2010-37
EXPNO	63
PROCNO	1
Date_	20100609
RG	5
NUC1	1H
SF01	500.1332750 MHz