

HUMBERTO SANTORO CARDOSO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E
METABOLIZAÇÃO *IN VITRO* DE TRÊS ANÁLOGOS DO
ANTIINFLAMATÓRIO PARSALMIDE**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do
Farmacêutico - Humberto Santoro Cardoso.*

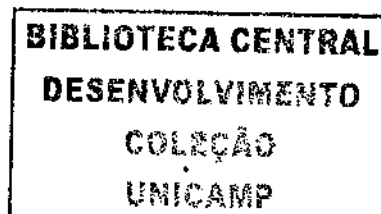
Campinas, 26 de julho de 2006.

Prof. Dr. José Luiz Donato

- Orientador -

CAMPINAS

2006



HUMBERTO SANTORO CARDOSO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E
METABOLIZAÇÃO *IN VITRO* DE TRÊS ANÁLOGOS DO
ANTIINFLAMATÓRIO PARSALMIDE**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a Obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.*

ORIENTADOR: DR. JOSÉ LUIZ DONATO

CAMPINAS

2006

ii

**BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8º / 6044

UNIDADE BC
Nº CHAMADA HUNICAMP
C179a

V _____ EX _____
TOMBO BC/ 71507
PROC. 16.200145-04
C _____
PREÇO 11,00
DATA 27/02/07
BIB-ID 401507

C179a

Cardoso, Humberto Santoro

Avaliação do potencial mutagênico e metabolização *in vitro* de três análogos do antiinflamatório parsalmide / Humberto Santoro Cardoso. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : José Luiz Donato
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Agentes Antiinflamatórios. 2. Teste de Mutagenicidade. 3. Mutagênese. 4. Metabólitos. I. Donato, José Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em ingles : Evaluation of the mutagenic potential and in vitro metabolization of three anti-inflammatory parsalmide analogues

Keywords: •Anti-inflammatory Agents

- Mutagenicity tests
- Mutagenesis
- Metabolites

Titulação: Mestrado em Farmacologia

**Banca examinadora: Prof Dr José Luiz Donato
Profa. Dra. Elen Cristina Teizen Landucci
Prof Dr Dárcio Gomes Pereira**

Data da defesa: 26-07-2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Donato

Membros:

Prof. Dr. José Luiz Donato

Prof. Dr. Dárcio Gomes Pereira

Profa. Dra. Elen Cristina Teizen Landucci

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 26/07/2006

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, a minha família e a todos que direta ou indiretamente tornaram esse sonho realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação André Tosello e a Galeno Research Unit por cederem espaço para realização do meu trabalho e a todos que colaboraram de alguma forma, sendo ajudando na bancada ou através de uma conversa amiga, em especial para Dra. Beatriz, Dra. Carla, Dra. Ivani, Fabiana, Ponciana, Aline, Josiane, Raquel, Ana Cecília e ao Dr. José Luiz Donato.

"A virtude deve desaparecer de novo e tornar-se inocência"

NOVALIS

| | <i>Pág.</i> |
|--|-------------|
| RESUMO | xv |
| ABSTRACT | xvii |
| INTRODUÇÃO | 19 |
| 1- Antiinflamatórios não esteroidais | 20 |
| 2- Mutação | 23 |
| 3- Mutagenicidade | 24 |
| 4- Teste de Ames | 25 |
| 4.1- Cepas..... | 27 |
| 4.2- Sequências alvo na detecção de substâncias mutagênicas..... | 29 |
| 5 - Metabolização de fármacos | 30 |
| 5.1- Metabolismo <i>in vitro</i> | 31 |
| 5.1.1 - Microsossomos hepáticos..... | 33 |
| 5.1.2 - Citosol..... | 34 |
| 5.1.3 - Fração S9..... | 34 |
| 6- Citocromo P450 | 35 |
| 6.1 - Localização, nomenclatura e estrutura..... | 35 |
| 6.2 - Mecanismo enzimático da Citocromo P450..... | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 7- Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-MS)..... | 39 |
| 7.1 - Ionização por “eletrospray” (ESI)..... | 40 |
| 8 - Parsalmide e seus análogos PA7, PA10 e PA31..... | 42 |
| JUSTIFICATIVA..... | 44 |
| OBJETIVOS..... | 46 |
| CAPÍTULOS..... | 48 |
| CAPÍTULO 1: <i>In vitro</i> mutagenicity of anti-inflammatory parsalmide analogues PA7, PA10, and PA31 is triggered by biotransformation into hydroxy derivatives..... | 49 |
| DISCUSSÃO..... | 72 |
| CONCLUSÃO..... | 75 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 77 |
| APÊNDICES..... | 90 |
| APÊNDICE 1: Publicação em congresso..... | 91 |
| APÊNDICE 2: Processo de avaliação do paper referente ao trabalho..... | 92 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| -A- | Adenosina |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| -C- | Citosina |
| COX-1 | Ciclooxigenase-1 |
| COX-2 | Ciclooxigenase-2 |
| COX-3 | Ciclooxigenase-3 |
| CYP | Citocromo P450 |
| Da | Daltons |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| ESI | Ionização por eletrospray |
| FAD | Flavina Adenina Dinucleotídeo |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FMN | Flavina Mononucleotídeo |
| g | Gramma |
| g | Força g |
| -G- | Guanina |
| h | Hora |
| his | Histidina |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta performance |
| IC50 | Concentração que inibe 50% da atividade enzimática |
| ICH | International Conference on Harmonisation |

| | |
|-------------------------|--|
| Kg | Quilograma |
| KV | Quilovolts |
| L | Litro |
| LC | Cromatografia líquida |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| MS | Espectrometria de massa |
| m/z | Razão massa – carga elétrica |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Difosfato (forma reduzida) |
| nm | Nanômetro |
| NSAIDs | Antiinflamatório não esteroideal |
| P450 | Citocromo P450 |
| PA7 | Análogo 7 do Parsalmide |
| PA10 | Análogo 10 do Parsalmide |
| PA31 | Análogo 31 do Parsalmide |
| PA7-OH | Análogo 7 do Parsalmide Hidroxilado |
| PA10-OH | Análogo 10 do Parsalmide Hidroxilado |
| PA31-OH | Análogo 31 do Parsalmide Hidroxilado |
| PGD₂ | Prostaglandina D ₂ |
| PGE₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PGF_{2α} | Prostaglandina F _{2α} |
| PGH₂ | Prostaglandina H ₂ |
| Rfa | Gene responsável pela síntese da membrana de lipopolissacarídeos |
| Rpm | Rotações por minuto |

| | |
|--------------------|-------------------------------------|
| S9 | Fração S9 hepática |
| -T- | Tiamina |
| <i>uvrB</i> | Gene responsável pelo reparo do DNA |
| Mg | Micrograma |
| μM | Micromolar |
| °C | Graus Celsius |

| | <i>Pág.</i> |
|---|-------------|
| Figura I- Síntese de prostaglandinas e mecanismo de ação dos NSAIDs..... | 20 |
| Figura II- Transferência de elétrons desde o NADPH até a citocromo P-450 catalisada pela NADPH-citocromo P-450 redutase..... | 37 |
| Figura III- Reações do complexo citocromo P-450 na oxidação do substrato..... | 38 |
| Figura IV- Estrutura dos compostos Parsalmide, PA7, PA10 e PA31..... | 43 |

LISTA DE QUADROS

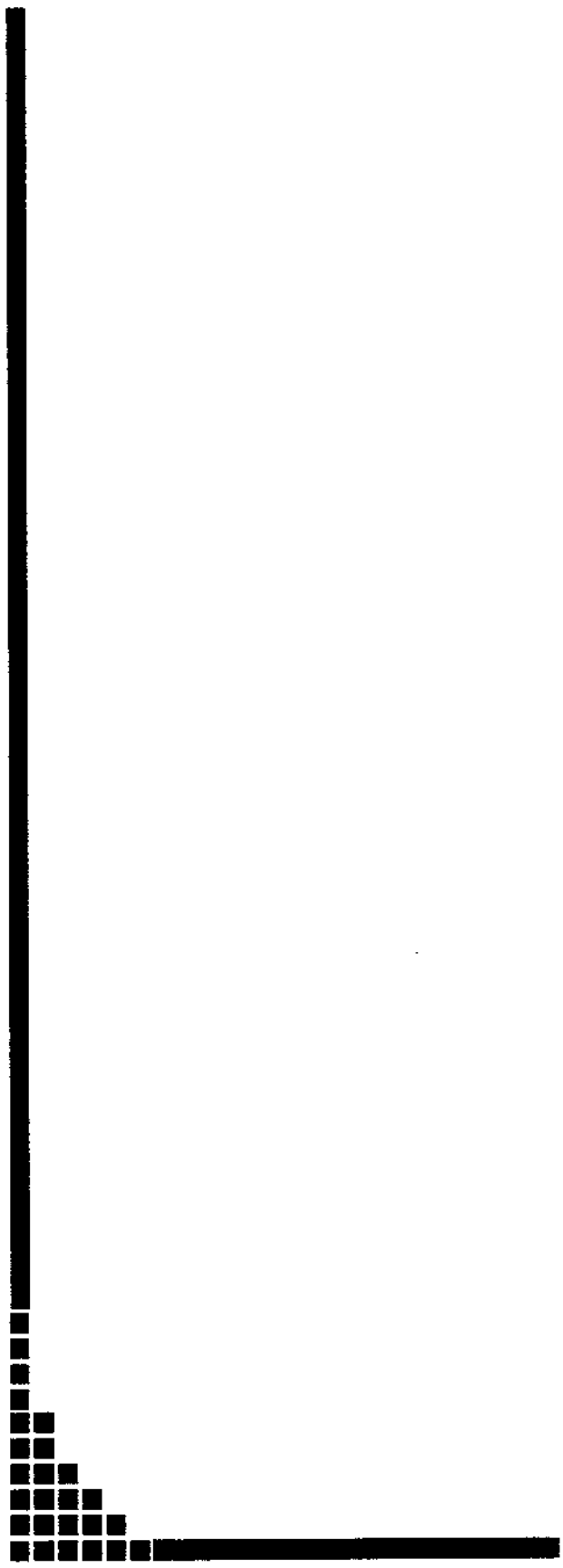
| | Pág. |
|--|-------------|
| Quadro I- Genótipo das cepas utilizadas no Teste de Ames..... | 29 |
| Quadro II- Divisão das enzimas em Fase I e Fase II..... | 33 |
| Quadro III- Possíveis reações metabólicas e as mudanças de cargas associadas..... | 40 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

| | <i>Pág.</i> |
|---|-------------|
| Tabela 1a- Atividade mutagênica dos análogos do Parsalmide no Teste de Ames usando a cepa TA98..... | 63 |
| Tabela 1b- Atividade mutagênica dos análogos do Parsalmide no Teste de Ames usando a cepa TA100..... | 64 |
| Tabela 2- Conversão dos análogos do Parsalmide em hidroxi-derivados pelo S9-mix..... | 65 |
| Figura 1- Parsalmide e seus análogos PA7, PA10 e PA31..... | 65 |
| Figura 2- Cromatogramas dos íons totais extraídos com éter etílico no processo de ativação metabólica do Teste de Ames incubados com (A) PA7, (B) PA10 e (C) PA31 por 30 min..... | 66 |
| Figura 3- Ionização por eletrospray com rastreamento completo (m/z 150 - 350 Da) dos espectros de massas da PA7, PA10, PA31 e seus correspondentes hidroxi-derivados catalisados pela fração S9.... | 67 |
| Figura 4 - Mecanismo de fragmentação de massa sugerido para PA7 e PA7-OH..... | 68 |
| Figura 5 - Mecanismo de fragmentação de massa sugerido para PA31 e PA31-OH..... | 69 |
| Figura 6 - Mecanismo de fragmentação de massa sugerido para PA10 e PA10-OH..... | 70 |
| Esquema 1- Síntese do composto PA31..... | 71 |

No presente estudo, foi avaliada a mutagenicidade de análogos do antiinflamatório Parsalimide [5-amino-N-butil-2-(2-própiniloxi)-benzamida], PA7 [5-amino-N-butil-2-ciclohexiloxi-benzamida], PA10 [5-amino-N-butil-2-fenoxi-benzamida] e PA31 [5-amino-N-butil-2-(p-toliloxi)-benzamida] através do Teste de Ames. Os experimentos foram realizados através da pré-incubação dos compostos na ausência e na presença da fração pós-mitocondrial (S9) de homogenatos de fígado de ratos tratados com fenobarbital/ β -naftoflavona. Nenhum efeito mutagênico foi observado após teste direto (ausência da fração S9) nas cepas TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537 de *Salmonella typhimurium*. Entretanto na presença da fração S9, as substâncias testadas provocaram resposta mutagênica nas cepas TA100 e TA98. A molécula PA31 apresentou o mais forte potencial mutagênico. As taxas de reversão na presença da molécula PA31 foram de 2-19 vezes maiores que as taxas de mutação espontânea. Na presença da molécula PA7 as taxas de reversão foram 2-14 vezes maiores que as taxas de mutação espontânea. Visto que o número de revertentes não excedeu 2,5 vezes o número de mutações espontâneas, a molécula PA10 mostrou um potencial mutagênico relativamente fraco. A análise por espectrometria de massa da biotransformação *in vitro* mostrou que a fração S9 converteu regioseletivamente (%) PA7 (19%), PA10 (7%) e PA31 (12%) em derivados hidroxilados.

Digitized by Google



ABSTRACT

In this study, the mutagenicity of the anti-inflammatory parsalmide [5-amino-N-butyl-2-(2-propynyloxy)-benzamide] analogues PA7 [5-amino-N-butyl-2-cyclohexyloxy-benzamide], PA10 [5-amino-N-butyl-2-phenoxy-benzamide] and PA31 [5-amino-N-butyl-2-(p-tolyloxy)-benzamide] was determined by an Ames Salmonella assay. The experiments were performed by preincubating the compounds in the absence and presence of a post-mitochondrial fraction (S9) of rat liver homogenate from phenobarbital/ β -naphthoflavone treated rats. No mutagenic effect was observed after direct testing (no S9 added) in *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537. However, in the presence of S9, the test substances triggered mutagenic responses in strains TA100 and TA98. PA31 presented the strongest mutagenic potential. The reversion rates in the presence of PA31 were about 2-19 folds higher than spontaneous mutation rates. In the presence of PA7, the reversion increased 2-14 folds over spontaneous rates. While PA10 showed a relatively mild mutagenic potential, as the number of revertants did not exceed 2.5 times the number of spontaneous mutations. Mass spectrometric analysis of the *in vitro* biotransformation showed that S9 converted (%), regioselectively, PA7 (19%), PA10 (7%) and PA31 (12%) into hydroxy-derivatives.



INTRODUÇÃO

1- Antiinflamatórios não esteroidais

Os antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs), são constantemente utilizados no tratamento da inflamação e seus efeitos terapêuticos, assim como, os efeitos colaterais, estão relacionados à sua capacidade de inibir a ciclooxigenase (COX) (VANE, 2000).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 60 milhões de receitas, são prescritas por ano contendo algum tipo de NSAIDs e o número de receitas é cerca de 3.6 vezes maior para pessoas idosas em relação aos jovens (SIMON, 2005).

A primeira grande descoberta para compreender o mecanismo de ação dos NSAIDs ocorreu 30 anos atrás, quando foi revelado que toda essa variedade de drogas reduzia a formação de prostaglandinas. Essa habilidade estava associada à capacidade de inibição da COX, que converte ácido araquidônico (liberado dos fosfolípidios de membrana pela ação das fosfolipase A₂), no precursor prostaglandina PGH₂ (VANE, 2000), afetando na síntese de certas prostaglandinas como PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ e tromboxano como mostrado na Figura I.

Três isoformas das enzimas ciclooxigenase são conhecidas: COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1, é uma isoforma constitutiva, responsável pela produção de prostaglandinas fisiológicas e com isso, faz a regulação de numerosas funções como homeostasia vascular e proteção gástrica (KULKARNI *et al.*, 2000)

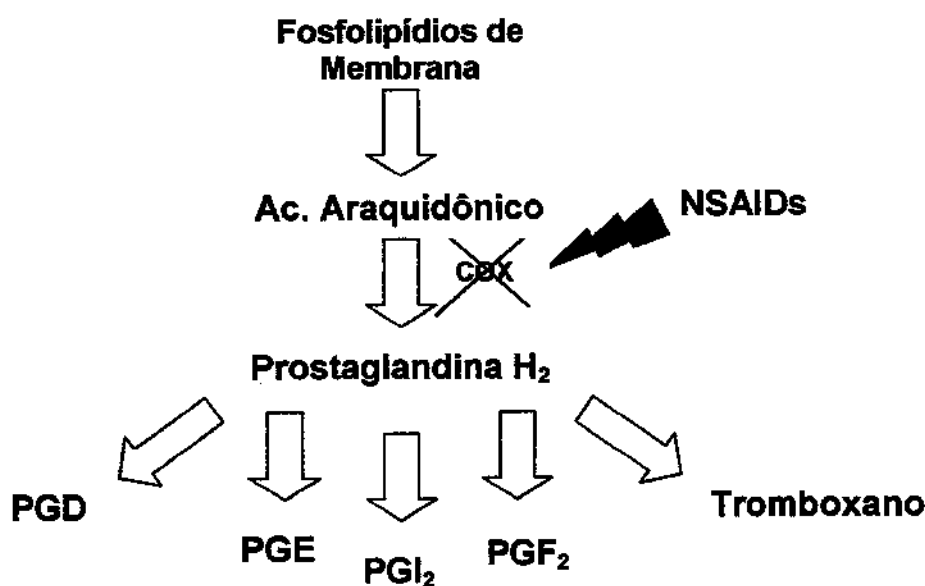


Figura I - Síntese de prostaglandinas e mecanismo de ação dos NSAIDs

A segunda isoforma, chamada COX-2, é uma enzima induzível, e expressada dentro de 4 a 24 horas em numerosos sistemas celulares por mediadores como lipopolissacarídeos, interleucina-A e vários mitógenos. Esta isoforma é considerada a fonte primária de prostaglandinas pró-inflamatórias, tornando-se assim um alvo apropriado para o desenvolvimento de drogas (WHITTLE, 2006).

Contudo, há áreas do organismo claramente identificadas, onde a expressão da COX-2 é fisiológica como no cérebro e em alguns casos, a COX-1 é relevante para o desenvolvimento de efeitos patológicos como câncer no ovário (WHELTON, 2000; GUPTA *et al.*, 2003).

Recentemente, a COX-3 foi descrita em humanos, sendo mais abundante no córtex cerebral e coração. A atividade da COX-3 comparada a COX-1 e 2, demonstrou que a enzima é potencialmente inibida por antiinflamatórios não esteroidais e inibida seletivamente por drogas com atividade analgésica e antipirética. Dessa forma, a inibição da COX-3, poderia representar um mecanismo central, pelo qual, essas drogas diminuem a dor e possivelmente a febre (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

Os NSAIDs têm sido associados a problemas gastrintestinais por um século. Em 1971 Vane descobriu que estas drogas reprimem a síntese de prostaglandinas, o que gerou a idéia que estes autacóides, poderiam ter papel importante na manutenção da mucosa gastrintestinal danificada (VANE, 1971).

Pouco tempo depois, prostaglandinas mostraram proteger o estômago e o intestino, contra os danos causados por uma variedade de agentes, incluindo os NSAIDs e etanol (Robert *et al.* 1976).

Análogos de prostaglandinas, como o misoprostol, foram introduzidos no mercado como agentes gastro-protetores e obtiveram um modesto sucesso comercial. A descoberta da segunda isoforma da ciclooxigenase, a COX-2 em 1991 (XIE *et al.* 1991), resultou em um grande estouro na atividade das indústrias farmacêuticas, que reconheceram o potencial dos inibidores seletivos na síntese de prostaglandinas nos sítios de inflamação. A hipótese para toda essa estratégia considerava que COX-2 era expressada exclusivamente no sítio de inflamação, por outro lado, COX-1 era expressada constitutivamente em tecidos como estômago e rim e produziria prostaglandinas responsáveis pela homeostasia nestes tecidos (MASFERRER *et al.*, 1994; VAN HECKEN *et al.*, 2000).

Dessa forma, foi proposto que a inibição seletiva da COX-2 não produziria efeitos adversos no trato gastrointestinal e no rim como os causados pelos NSAIDs tradicionais, no entanto, produziriam efeitos benéficos, reduzindo a inflamação e a dor, assim essa hipótese foi rapidamente aceita pelas indústrias farmacêuticas.

Nos Estados Unidos, foi constatado, que cerca de 5 a 7% de internações em hospitais, são relacionadas a efeitos adversos de drogas, e dessas hospitalizações, aquelas que resultam de problemas gastrintestinais, sistema nervoso, renal ou efeitos alérgicos causados por Aspirina[®] ou NSAIDs não seletivos, são responsáveis por aproximadamente 30% (SIMON, 2005).

Tendo-se isso como base, novos inibidores seletivos para COX-2, têm sido desenvolvidos e alguns já são comercializados (JACKSON e HAWKEY, 2000), como celecoxibe (Celebra[®]), lumiracoxibe (Prexige[®]), etoricoxibe (Arcoxia[®]).

Contudo, começaram a surgir problemas na fase clínica, em relação ao risco de eventos tromboembólicos no estudo de agentes seletivos para COX-2, e por isso alguns centros de pesquisas, começaram a investir em pesquisas para avaliar os riscos de determinadas drogas. Foi o caso do VIGOR (Vioxx Gastrintestinal Outcomes Research), que investigou a segurança gastrintestinal do rofecoxibe, em pacientes com artrite reumatóide e constatou estatisticamente, que ocorreram mais eventos cardiovasculares tromboembólicos como efeitos secundários em pessoas que receberam 50 mg de rofecoxibe uma vez ao dia, que naquelas que receberam 500 mg de naproxeno duas vezes ao dia, a incidência de infarto do miocárdio não letal foi de 0.5 versus 0.1% respectivamente (SIMON, 2005).

Devido a esse tipo de problema, hoje em dia no Brasil, os inibidores seletivos da COX-2, rofecoxibe (Vioxx[®]) e valdecoxibe (Bextra[®]), foram retirados das prateleiras das farmácias por determinação da ANVISA (2005)¹.

¹ <http://www.anvisa.gov.br/>

Entretanto, recentes publicações, sugerem que prostaglandinas derivadas da COX-2, contribuem para a defesa da mucosa gástrica em camundongos deficientes de COX-1, pois COX-2 é rapidamente expressada quando a mucosa é danificada, e parece ter um papel importante para facilitar o reparo da úlcera (LANGENBACH *et al.*, 1995; JONES *et al.* 1999, MIZUNO *et al.*, 1997; MA *et al.*, 2002; SCHMASSMANN *et al.*, 2006).

A administração de inibidores seletivos de COX-2 em roedores com úlcera gástrica, resulta num retardo do processo de cura (MIZUNO *et al.*, 1997; MA *et al.*, 2002; SCHMASSMANN *et al.*, 2006).

Porém, a administração de inibidores seletivos de COX-1, não afeta na cura da úlcera gástrica (SCHMASSMANN *et al.*, 2006).

Alguns estudos sugerem que seja necessária, a inibição de ambas isoformas (COX-1 e 2), para produzir um dano gástrico agudo, embora uma avaliação futura seja necessária, usando agentes altamente específicos para ambas isoformas e deleção de genes específicos da COX em animais (WHITTLE, 2006).

Dessa forma, a relação entre os efeitos terapêuticos e efeitos colaterais, tem sido, o principal objetivo no desenvolvimento e síntese de novos antiinflamatórios não esteroidais.

2- Mutação

Mutação pode ser definida, como um erro na replicação ou outra alteração da seqüência da base dos nucleotídeos, que pode levar a uma mudança na seqüência de pares de bases em uma molécula do DNA. Se a mudança ocorrer no DNA de uma célula somática, a mutação pode causar uma mudança no fenótipo do organismo (conduzindo, por exemplo, ao câncer), mas não afetará a geração futura; somente mutações em células germinativas podem causar mudanças hereditárias atingindo gerações futuras (MAKI, 2002).

As mutações pontuais podem ser divididas em: mutação por substituição, mutação por inserção e mutação por deleção.

- ✓ Mutações por substituição, é um tipo de mutação que causa a substituição de um único par de bases por outro par.
- ✓ Mutações por inserção adicionam um ou mais nucleotídeos ao DNA, a maioria dessas mutações pode causar no gene deslocamento no quadro da leitura (frameshift) e assim alterar significativamente o produto do gene.
- ✓ Mutações por deleção removem um ou mais nucleotídeos do DNA. Como as mutações por inserção, essas mutações podem alterar o quadro da leitura do gene e são irreversíveis (GRIFFITHS *et al.* 1999).

3 - Mutagenicidade

A capacidade de um agente químico (agentes alquilantes como N-etil-N-nitrosourea, agentes metilantes como etano metil sulfonato, hidrocarbonetos policíclicos como benzopirenos, agentes que intercalam DNA como brometo de etídio) ou físico (radiação ultravioleta, radiação ionizante), causar a alteração permanente do material genético dentro de células vivas, é caracterizada como mutagenicidade (RIEGER *et al.*, 1991).

A presença de substâncias mutagênicas e pró-mutagênicas no meio ambiente constituem uma ameaça à saúde humana. Durante a vida, estamos susceptíveis a mutações espontâneas, porém expostos também a substâncias que podem induzir mutações, incluindo constituintes da dieta alimentar, poluentes, drogas entre outros (AMES, 1979; MALLING, 2004).

Entre as décadas de 50 e 60, tornou-se mais claro, que o mecanismo que conduz exclusivamente a compostos de menor toxicidade, às vezes produz metabólitos intermediários reativos que poderiam interagir com o DNA e causar mutações (MALLING, 2004).

Dessa forma, ensaios foram desenvolvidos, visando testar a mutagenicidade de vários compostos, dentre estes ensaios, o Teste de Ames é o mais conhecido pela rapidez, simplicidade e grande capacidade em detectar agentes mutagênicos.

4- Teste de Ames

Na década de 70, o grupo do pesquisador Bruce N. Ames, desenvolveu uma técnica que utiliza diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* em um ensaio mutagênico. Colônias mutantes foram selecionadas por crescimento sobre meio de cultura mínimo, suplementado com um traço de histidina, para permitir um crescimento limitado das células dependentes de histidina e expressão do fenótipo mutante (AMES *et al.*, 1973a; AMES *et al.*, 1975; MCCANN e AMES, 1976a; MCCANN e AMES, 1976b).

O Teste de Ames, é um ensaio de mutação reversa em bactérias, especificamente designado para detectar uma grande faixa de substâncias químicas, que podem produzir um dano genético conduzindo a mutação no gene (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

O Teste de Ames, é chamado de ensaio de mutação reversa, porque as cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas são histidina-dependente (his^-), pois diferentes mutações foram inseridas em vários genes do operon da histidina. Cada uma dessas mutações é capaz de responder a substâncias mutagênicas, com diferentes tipos de mecanismos de ação. Sendo assim, as cepas são incapazes de sintetizar histidina e somente quando uma substância mutagênica consegue reverter essas mutações (his^+), a bactéria produz histidina, conseguindo sobreviver e formar colônias.

Muitas substâncias carcinogênicas e não-carcinogênicas foram testadas e os resultados comparados entre laboratórios pelo mundo todo, cerca de 85% das substâncias carcinogênicas testadas, foram detectadas como mutagênicas, entre essas substâncias, estão incluídas uma grande variedade de agentes alquilantes, nitrosaminas, hidrocarbonetos policíclicos, toxinas fúngicas, aminas aromáticas, nitrofuranos carcinogênicos, uma variedade de agentes antineoplásicos e antibióticos carcinogênicos como adriamicina, daunomicina, e mitomicina C (AMES *et al.*, 1975).

Dessa forma, é importante entender a relação entre substâncias mutagênicas e carcinogênicas.

Uma substância carcinogênica, é qualquer agente que promova câncer.

As substâncias carcinogênicas são frequentemente, mas não necessariamente, mutagênicas. Substâncias carcinogênicas causam câncer alterando o DNA das células, interferindo com os processos biológicos normais. Geralmente, as células são capazes de detectar e assim tentam reparar o DNA; caso não consigam, submetem-se à morte para não causar maiores danos. Quando os danos interferem na morte celular ou incentivam a divisão da célula, pode ocorrer o câncer (TRAVIS, 1988).

Porém, um trabalho publicado em 1997 por Fetterman e colaboradores, mostrou que a relação entre a potência mutagênica e a carcinogenicidade quantitativa, é muito fraca, sendo assim prevalece apenas uma relação qualitativa (FETTERMAN *et al.*, 1997).

Contudo, muitas substâncias não são ativas antes de serem metabolizadas, assim requerem ativação metabólica para que intermediários reativos mostrem seus efeitos biológicos (WRIGHT, 1980).

Uma componente chave para o teste de mutagenicidade bacteriana, foi a inclusão de um sistema de ativação metabólica exógena chamada fração S9, proveniente de fígado de rato (AMES *et al.*, 1973b; MALLING, 1971).

Pesquisadores como Ames e Kier, utilizando procedimentos de indução enzimática, observaram que fígados de ratos induzidos por Aroclor 1254, eram eficientes em detectar diferentes classes de substâncias carcinogênicas (AMES *et al.*, 1973b; KIER *et al.*, 1974).

No entanto, Aroclor 1254, é uma substância carcinogênica de grande estabilidade, podendo ser mais perigoso para os pesquisadores do que as próprias substâncias carcinogênicas em estudo (SHAHIN *et al.*, 1979).

Alternativas para a indução enzimática, foram propostas chegando à combinação de duas drogas: fenobarbital e β -naftoflavona. A associação desses dois indutores produz uma indução similar ao Aroclor 1254, podendo assim substituí-lo em testes de mutagenicidade (ELLIOTT *et al.*, 1992).

Estes indutores estão divididos em duas categorias:

- ✓ Indutores “tipo fenobarbital”
- ✓ Indutores “tipo hidrocarboneto aromático policíclico”

Os indutores “tipo fenobarbital”, geralmente induzem uma ou mais isoformas de citocromo P-450 (MASON, 1965).

Fenobarbital é um indutor que exerce ação sobre as subfamílias CYP1A, CYP2A, CYP2B e CYP3A, porém os membros da subfamília CYP2B são induzidos mais intensamente, esse efeito tem papel essencial na metabolização de xenobióticos, pois essas subfamílias são responsáveis pela metabolização da grande maioria deles (WAXMAN e AZAROFF, 1992; CZEKAJ, 2000).

Em contraste, indutores “tipo hidrocarboneto aromático policíclico”, induzem uma forma específica do citocromo P-450, a subfamília CYP1A (RAUNIO *et al.*, 1995).

A β -naftoflavona, um indutor “tipo hidrocarboneto aromático policíclico”, induz a subfamília CYP1A, desde então essa enzima tem sido estudada extensivamente, pois mostrou catalisar a ativação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos à metabólitos carcinogênicos (CONNEY, 1982).

Cerca de 90% de fármacos de uso clínico, são metabolizados pelas famílias 1, 2 e 3 da citocromo P-450 (ALVARES e PRAT, 1990).

4.1- Cepas

Cinco cepas histidina-dependente, são usadas no teste de mutagenicidade de Ames - TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537 - cada cepa, contém um tipo diferente de mutação no “operon” da histidina. Em adição à mutação referente à histidina, as cepas têm mutações que aumentam extremamente sua sensibilidade para detectar substâncias mutagênicas.

A mutação *rfa*, causa perda parcial da barreira de lipopolissacarídeos, que reveste a superfície da bactéria e aumenta a permeabilidade facilitando a penetração de moléculas com alto peso molecular. Outra mutação adicionada, é a chamada *uvrB*, que consiste na deleção do gene que codifica o sistema de reparo do DNA, aumentando extremamente a sensibilidade na detecção de muitas substâncias mutagênicas. Além disso, as cepas que apresentam a mutação *uvrB*, necessitam de biotina para crescer e formar colônias, pois apresentam um dano no gene responsável pela síntese de biotina (AMES *et al.*, 1973a). (Quadro I)

Além das mutações já descritas, foram inseridos plasmídeos como o pKM101 e o pAQ1, dando assim algumas características peculiares às cepas. (Quadro I)

Plasmídeos, são pequenos pedaços de DNA (normalmente circulares) encontrados fora do cromossomo e capazes de se auto-replicar. São as principais ferramentas para a inserção de novas informações genéticas em microorganismos (RIEGER *et al.*, 1991).

O plasmídeo pKM101, acentua a mutação induzida por luz ultravioleta e substâncias químicas, através do aumento no funcionamento do sistema de reparo do DNA denominado "error-prone" e confere resistência a ampicilina, que é um conveniente marcador para detectar a presença do plasmídeo (MCCANN e AMES, 1976a; SHANABRUCH e WALKER, 1980; WALKER e DOBSON, 1979; MORTELMANS e STOCKER, 1979).

A inserção de uma mutação no "operon" da histidina em múltiplas cópias do plasmídeo pAQ1, aumenta o número de sítios alvo e também confere resistência à tetraciclina, que é um conveniente marcador para detectar a presença do mesmo (LEVIN *et al.*, 1982).

Quadro I- Genótipo das cepas utilizadas no Teste de Ames

| Mutação (cepa) | Mutação <i>uvrB</i> | Defeito na Membrana de Lipopolissacarídeos | Plasmídeo |
|-----------------|---------------------|--|-------------|
| <i>hisG46</i> | | | |
| TA1535 | mutação por deleção | <i>rfa</i> | Ausente |
| TA100 | mutação por deleção | <i>rfa</i> | pKM101 |
| <i>hisD3052</i> | | | |
| TA98 | mutação por deleção | <i>rfa</i> | pKM101 |
| <i>hisC3076</i> | | | |
| TA1537 | mutação por deleção | <i>rfa</i> | Ausente |
| <i>hisG428</i> | | | |
| TA102 | tipo selvagem | <i>rfa</i> | pKM101/pAQ1 |

4.2- Sequências alvo na detecção de substâncias mutagênicas

Algumas sequências de DNA são comumente usadas como alvo no Teste de Ames, a mutação *hisG46* encontrada nas cepas TA100 e TA1535, resulta da substituição de GAG/CTC por GGG/CCC, que é revertida ao tipo selvagem por substâncias que causam mutação por substituição de par de bases como a Azida sódica (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

A mutação *hisD3052* presente na cepa TA98, está inserida próxima à sequência repetitiva -C-G-C-G-C-G-C-G- alterando sua leitura. Este tipo de mutação pode ser revertido ao tipo selvagem, por substâncias mutagênicas que causam mutação por "frameshift" como 2-nitrofluoreno e vários aromáticos nitrosos derivados de aminas carcinogênicas, devido a uma deleção de par de bases do DNA (ISONO e YOURNO, 1974).

A cepa TA1537 carrega uma mutação chamada *hisC3076*, que tem como alvo uma alteração próxima ao sítio de repetição -C-C-C- e pode ser revertida ao tipo selvagem, por substâncias mutagênicas que causam mutação por “frameshift” por adição de par de bases ao DNA próximo ao sítio de repetição como a mutação provocada pela 9-aminoacridina, entretanto, diferentes das detectadas pela cepa TA 98 (AMES *et al.*, 1973a).

Na cepa TA102, a mutação é carregada em múltiplas cópias do plasmídeo pAQ1. A mutação *hisG428* inserida nessa cepa tem a sequência alvo TAA, que pode ser revertida por transições (substituição de base púrica por base púrica ou pirimídica por pirimídica) e transversões (substituição de bases púricas por pirimídicas ou pirimídicas por púricas) no DNA. A cepa TA102 pode ser revertida por substâncias mutagênicas que causam dano oxidativo e detectam agentes “cross-linking”, ou seja, que intercalam as fitas do DNA como mitomicina C (LEVIN *et al.*, 1982).

5 - Metabolização de fármacos

A enzima citocromo P-450, é a principal responsável pelo metabolismo oxidativo dos fármacos. Sua expressão está regulada por vários fatores: genéticos (formas polimórficas), fisiopatológicos (regulação hormonal, enfermidades), e ambientais (fatores nutricionais, indução, inibição), que condicionam os níveis hepáticos das enzimas P-450 as quais variam extraordinariamente entre indivíduos (SHIMADA *et al.*, 1994).

O metabolismo hepático dos fármacos tem uma notável influência sobre o “clearance” plasmático e é a causa mais freqüente da variabilidade individual, que se observa nos parâmetros farmacocinéticos. Esta variabilidade, explica as notáveis diferenças observadas no metabolismo de fármacos e justifica a aparição de alterações na resposta farmacológica ou de diferenças individuais, na susceptibilidade à ação de agentes tóxicos ou carcinogênicos (SPATZENEGGER e JAEGER, 1995; LU, 1998; FUHR, 2000; INGELMAN-SUNDBERG, 2001).

O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo longo e custoso, no qual se investiga se a molécula reúne os requisitos de eficácia terapêutica e segurança, exigidos pelas autoridades sanitárias para sua comercialização e administração no ser humano. A seleção das moléculas candidatas, não é feita somente em função da sua atividade farmacológica, mas também, em função dos riscos tóxicos. A toxicidade depende da capacidade que o fármaco tem, de agredir estruturas ou processos celulares e os níveis celulares que alcançaram (SPATZENEGGER e JAEGER, 1995).

A resposta farmacológica a um agente terapêutico, é o resultado da interação do agente com a célula alvo e por consequência a transdução de sinal. Os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção aos quais são submetidos os fármacos, regulam sua concentração no sítio de ação e, portanto, têm um papel determinante na sua eficácia farmacológica. Um fármaco com uma farmacocinética inapropriada, pode originar uma resposta inadequada ou muito variável que comprometa seu uso terapêutico (THOMPSON, 1997).

Dada a transcendência clínica, hoje em dia, as etapas iniciais do desenvolvimento de novos fármacos, também incluem a caracterização metabólica do composto. Tendo em vista, que a citocromo P-450, é o elemento chave no metabolismo de fármacos, os avanços metodológicos que tem permitido ampliar os conhecimentos bioquímicos, sobre esse sistema enzimático têm possibilitado o desenvolvimento de melhores estratégias para o estudo do metabolismo de fármacos. Dessa forma, os ensaios *in vitro* utilizando-se CYP, oferecem ao pesquisador, a possibilidade de examinar de forma controlada e reproduzir em um modelo simplificado, as situações que ocorrem no organismo e constituem ferramenta importante para estudar o metabolismo de novas moléculas na fase pré-clínica de seu desenvolvimento (MCGINNITY e RILEY, 2001).

5.1- Metabolismo *in vitro*

Existem numerosas vantagens no uso de modelos *in vitro* no estudo do metabolismo de drogas. Nesses ensaios, é muito importante obter informações, que cheguem o mais perto da situação humana *in vivo*. Uma tendência atual é transferir o estudo do metabolismo das drogas para uma fase inicial do desenvolvimento da droga. Modelos *in*

vitro, têm sido desenvolvidos com enzimas da família da citocromo P-450. Atualmente, é observada uma tendência de alteração na ênfase de experimentos com modelos animais para estudos *in vitro* com enzimas humanas (MINERS *et al.*, 1994).

A metabolização ocorre em muitos tecidos como rim, pele, pulmão e intestino, porém o fígado é o órgão com maior expressão de citocromo P-450 e, portanto com maior capacidade de metabolização (LU e KACEW, 1996).

A metabolização, biotransformação ou ativação metabólica pode ser dividida em dois tipos de reações:

- ✓ Reações de fase I que compreendem reações de hidrólise, oxidação e redução, as quais aumentam a polaridade e a excreção dos compostos. O resultado da fase I não é necessariamente um metabólito inativo, como é o caso da codeína, a qual é demetilada originando a morfina, um composto mais potente (CONE *et al.*, 1983).

Mas frequentemente as reações de fase I são estágios que antecedem futuras reações, expondo sítios reativos da molécula para subseqüentes reações de fase II (KOSTIAINEN *et al.*, 2003).

- ✓ Reações de fase II, que compreendem as reações de conjugação, as quais fazem conjugação de grupos volumosos e polares e com isso frequentemente cessa a atividade e aumenta a eliminação do substrato (Kostiainen *et al.*, 2003).

Somente em raros casos, como acontece com a morfina-6-O-glucuronídeo, o metabólito conjugado é mais potente que o composto íntegro (PAUL *et al.* 1989). As principais enzimas de metabolização de fase I e II podem ser observadas do QUADRO II.

Quadro II- Divisão das enzimas em Fase I e Fase II. (Adaptado de SMITH *et al.*, 2001).

| | |
|--|----------------|
| Citocromo P-450 monooxigenase | |
| Aldeído desidrogenase | |
| Álcool desidrogenase | FASE I |
| Epóxido hidrolase | |
| Monoamino oxidase | |
| Flavina monoamino oxidase | |
| N- e O- metiltransferases não específicas | |
| Ácido D-glucurônico transferase | |
| Catecol o-metiltransferase | FASE II |
| Glutathiona transferase | |
| Sulfato transferase | |

Várias preparações hepáticas obtidas por centrifugação diferencial, são usadas no estudo da biotransformação *in vitro*. Dentre elas temos microsossomos, citosol e fração S9 (BRANDON *et al.*, 2003).

5.1.1 - Microsossomos hepáticos

Microsossomo hepático é um dos modelos mais utilizados na metabolização *in vitro*. Trata-se de um sistema subcelular, obtido através da centrifugação de homogenatos de fígado a 100000 x g, que permite uma purificação parcial das membranas do retículo endoplasmático liso onde, são encontradas as citocromo P450 e outras enzimas. Entre suas vantagens estão a facilidade de preparação, sua grande acessibilidade, sua estabilidade e sua elevada atividade biotransformadora (BRANDON *et al.*, 2003).

Todas essas características tornam este modelo biológico o mais popular para o estudo de metabolismo. Por outro lado, a principal limitação dos microsossomos hepáticos, é que estão presentes apenas enzimas unidas à membrana, principalmente as citocromo P-450, estando ausentes as enzimas citosólicas de conjugação (PEARCE *et al.*, 1992).

5.1.2 - Citosol

A fração citosólica hepática contém enzimas solúveis de fase II como a N-acetil transferase, glutatona S-transferase e sulfotransferase que podem ser obtidas por centrifugação diferencial de homogenato de fígado, como os microsossomos. Para a atividade catalítica de enzimas de fase II, é necessária a adição de cofatores exógenos como, por exemplo, glutatona para a enzima glutatona S-transferase. A principal vantagem é a presença de apenas três enzimas na fração citosólica a altas concentrações, quando comparadas à fração S9 hepática e a maior desvantagem, é que somente as enzimas de fase II solúveis estão presentes na fração citosólica hepática (BRANDON *et al.*, 2003).

5.1.3 - Fração S9

A fração S9 hepática contém as frações microsossomal (enzimas de fase I) e citosólica (enzimas de fase II). Um sistema regenerador de NADPH é usado para fornecer a demanda de energia das enzimas citocromo P-450, e co-fatores responsáveis pela oxidação das drogas (BRANDON *et al.*, 2003).

A fração S9 hepática é aplicada principalmente combinada ao Teste de Ames. A fração S9 é preparada a partir de fígado de animais, centrifugados a 9000 x g e a atividade das enzimas hepáticas como as citocromo P-450, pode ser aumentada intensamente quando os animais são expostos a diversas drogas, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e xenobióticos do meio ambiente (MARON e AMES, 1983).

Comparada aos microsossomos e citosol, a fração S9 oferece uma representação mais completa do perfil metabólico, pois contém atividade das enzimas de fase I e II. Por outro lado a atividade das enzimas na fração S9 é reduzida quando comparada aos microsossomos e citosol (BRANDON *et al.*, 2003).

6- Citocromo P450

6.1- Localização, nomenclatura e estrutura.

A citocromo P-450 foi descoberta na década de cinquenta. Inicialmente, citocromo P-450 foi um termo usado para identificar uma hemoproteína microsossomal hepática com absorção máxima de 450nm, e assim denominada pigmento 450 ou P-450 (SETCHELL *et al.*, 1998; CHLANG *et al.*, 2000; JANOWSKI *et al.*, 1999).

Essas enzimas contêm um grupo heme por molécula de proteína e catalisam monooxigenações junto com NADPH e oxigênio molecular (CRESTANI *et al.*, 1995; SCHWARZ *et al.*, 1997; HUNT *et al.*, 2000; OKUDA *et al.*, 1995).

As citocromos P-450 estão presentes em seres eucariotes, nas membranas do retículo endoplasmático e na membrana interna mitocondrial (HOLICK, 1994).

Atualmente é sabido que, a superfamília das enzimas citocromo P-450 é formada por cerca de 500 membros, os quais têm sido classificados em famílias e subfamílias baseados na identidade da seqüência de aminoácidos. (NELSON *et al.*, 1996).

Enzimas que tem uma identidade de 40% ou mais de aminoácidos, pertencem à mesma família, e se a identidade for maior que 55%, pertencem à mesma subfamília. A sigla CYP é usada para caracterizar a respectiva P-450 como hemoproteína. O primeiro número arábico define a família gênica (ex. CYP1), a letra seguinte à subfamília (ex. CYP1A) e o segundo número a enzima individual (ex. CYP1A1, CYP1A2) (VENKATAKRISHNAN *et al.*, 2001).

As enzimas citocromo P-450, catalizam o ataque oxidativo a compostos de natureza orgânica (hidrocarbonetos e seus derivados) não ativados. As citocromo P450 requerem elétrons para reduzir o oxigênio molecular e podem ser classificadas em quatro

classes, em função de como cedem elétrons desde o NADPH até o centro catalítico da enzima (WERCK-REICHHART e FEYEREISEN, 2001).

- ✓ Proteínas de classe I – utilizam uma redutase que contem FAD e uma ferrosulfoproteína (ferridoxina).
- ✓ Proteínas de classe II – utilizam uma cadeia de transferência de elétrons mais curta e só necessitam uma redutase da citocromo P-450 que contem FAD/FMN para a transferência de elétrons.
- ✓ Proteínas de classe III – são auto-suficientes e não requerem doador de elétrons.
- ✓ Proteínas de classe IV – recebem os elétrons diretamente do NAD(P)H.

Nos organismos eucariontes, as P-450 de classe I encontram-se associadas à membrana interna da mitocôndria. As enzimas de classe II são as mais abundantes em eucariontes, as enzimas P-450 e NADPH–citocromo P-450 redutase, não estão associadas e ambas estão ligadas de forma independente ao lado externo da membrana do retículo endoplasmático como ilustra a Figura II.

As P-450 da classe I e da classe II participam dos processos de metabolização tanto em plantas como em animais. Tratam-se de enzimas de grande importância do ponto de vista farmacológico e toxicológico, pois são as responsáveis pelo metabolismo e detoxificação de fármacos e muitas vezes participam do processo de ativação contribuindo para a aparição de fenômenos tóxicos ou carcinogênicos (HONKAKOSKI e NEGISHI, 2000).

As P450 de classe III participam da síntese de prostaglandinas em mamíferos, enquanto que a P450 da IV foram identificadas somente em fungos (MANSUY, 1998).

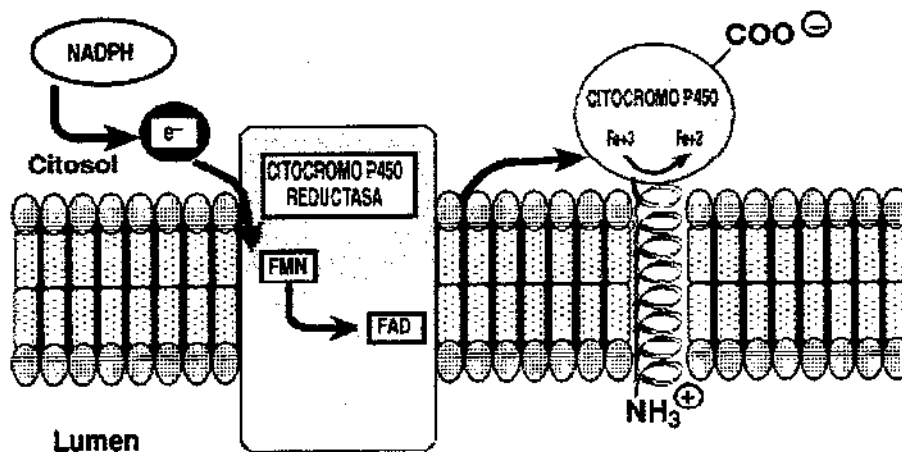


Figura II - transferência de elétrons desde o NADPH até a citocromo P-450 catalisada pela NADPH-citocromo P-450 redutase (Adaptado de ORELLANA e GUAJARDO, 2004).

6.2 - Mecanismo enzimático da Citocromo P450

As citocromo P-450 são denominadas monooxigenases, pois o termo se refere à forma como o oxigênio molecular é incorporado ao produto. Na hidroxilação, um átomo de oxigênio é adicionado ao substrato e o outro contribui para a formação de uma molécula de água.

Este processo requer a doação seqüencial de dois elétrons assim, na membrana do retículo endoplasmático, a NADPH-citocromo P-450 redutase é o doador de elétrons usual, embora o citocromo b_5 também possa participar (VERGERES e WASKELL, 1995).

A citocromo P-450 catalisa a monooxigenação de uma variedade de moléculas orgânicas, através de um mecanismo que envolve vários passos como mostrado na Figura III.

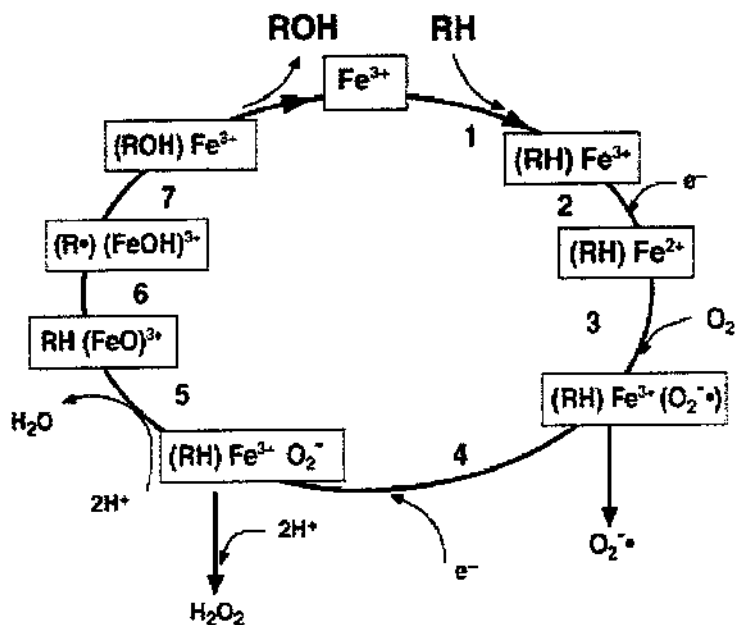


Figura III - Reações do complexo citocromo P-450 na oxidação do substrato (Adaptado de COON *et al.*, 1992).

O ciclo envolve os seguintes passos:

- 1- ligação do substrato RH ao Fe^{+3} ;
- 2- redução do complexo férrico enzima – substrato ($Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$)
- 3- ligação do oxigênio molecular ao complexo ferroso enzima-substrato, com provável geração de superóxido;
- 4- transferência do segundo elétron do NADPH ao complexo enzima-substrato via NADPH citocromo P450 redutase ou citocromo b_5 e protonação do átomo de oxigênio distal por um íon hidrogênio com provável produção de peróxido de hidrogênio;
- 5 - liberação de uma molécula de H_2O
- 6- formação do radical livre
- 7- formação do produto hidroxilado

7- Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-MS)

É estimado que, para cada 5000 substâncias químicas avaliadas em programas de desenvolvimento de novas drogas, somente uma é aprovada para entrar no mercado. Entre as maiores razões para chegar ao fim do desenvolvimento de uma nova substância química além da eficácia, o fator dominante é não ser tóxica e ter propriedades farmacocinéticas favoráveis. Isto tem forçado a indústria farmacêutica, a modificar o procedimento durante a descoberta da droga e a desenvolver novas tecnologias para aumentar a produtividade e eficiência durante a fase de descoberta. Entre as propriedades farmacológicas estudadas, a caracterização metabólica é a chave e hoje em dia tem integrado a fase de descoberta de novas drogas (KOSTIAINEN *et al.*, 2003).

Assim a cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS), é uma técnica analítica utilizada para análise de metabólitos que acopla a alta resolução cromatográfica com a sensibilidade e especificidade do espectrômetro de massas (LIM e LORD, 2002).

Há mais de uma década a espectrometria de massas utilizando-se da técnica de ionização das amostras por “eletrospray”, surgiu como uma importante técnica que fornece uma ferramenta sensível, robusta e de confiança para estudar amostras com concentrações extremamente pequenas, biomoléculas não voláteis e termolábeis que não são facilmente analisadas por técnicas convencionais.

A Cromatografia Líquida de Alta Performance, serve como um pré-fracionamento molecular para posterior análise no espectrômetro de massas. HPLC/MS tornou-se uma poderosa técnica na análise de moléculas grandes e pequenas de várias polaridades em amostras biológicas complexas (HO *et al.*, 2003).

Assim o primeiro passo para análise de um metabólito é a identificação de todos os possíveis metabólitos, o segundo passo é a caracterização estrutural e por fim sua quantificação. A identificação dos metabólitos é feita através da comparação dos íons contidos nos cromatogramas das amostras e no branco, para isso, existem programas que

auxiliam na identificação do metabólito. Esse programa faz uma triagem em todos os íons contidos no cromatograma do metabólito esperado, de acordo com os ganhos ou as perdas na massa do metabólito, comparado com a massa molecular da droga mãe dessa forma auxiliando na caracterização estrutural (QUADRO III). Os picos detectados nos cromatogramas, correspondem à razão da massa pela carga do íon do possível metabólito. Através do cálculo da área do pico, é feita a quantificação seja da droga ou do seu metabólito. Os programas são baseados na detecção de íons protonados, deprotonados ou dutos, e não na detecção de fragmentos de íons. Assim, para o composto ser identificado, não deve ser dissociado extensivamente no processo de ionização, dessa forma, como a ionização por “eletrospray” (ESI) é um processo suave, tem sido a melhor escolha nas análises de metabólitos (OLIVEIRA e WATSON, 2000).

Quadro III – Possíveis reações metabólicas e as mudanças de cargas associadas (Adaptado de SINZ e PODOLL, 2002).

| Reação metabólica | Mudança na massa (u) |
|-------------------|----------------------|
| Demetilação | -14 |
| N-Hidroxilação | +16 |
| N-Oxidação | +16 |
| Metilação | +14 |
| Acetilação | +42 |
| Sulfatação | +80 |
| Glucuronidação | +176 |

7.1 - Ionização por “eletrospray” (ESI)

A ESI usa a energia elétrica para auxiliar a transferência dos íons da solução para a fase gasosa antes de serem submetidos à análise espectrométrica assim, espécies iônicas podem ser analisadas por ESI-MS com muita sensibilidade, porém, compostos neutros também podem ser convertidos à forma iônica por protonação ou deprotonação.

O espectro de massas é um gráfico relativo à abundância de sinais do íon em relação à razão (m/z). Dessa forma, é muito comum que o sinal mais alto seja 100% de abundância e todos os outros sejam expressos em função desses (HO *et al.*, 2003).

8 - Parsalmide e seus análogos PA7, PA10 e PA31

O Parsalmide [5-amino-N-butil-2-(2-propiniloxi)-benzamida] é uma droga com atividade antiinflamatória, sintetizada originalmente na Itália na década de 70 (MAFFI *et al.*, 1976; PEDRAZZOLI *et al.*, 1976).

Está disponível comercialmente desde 1985, com o nome comercial Synovial® e tem sido utilizado para tratar pacientes com artrite (FARNETI e COLOMBO, 1976; MENCI *et al.*, 1976; SANGUINETTI e BONIFAZI, 1976; TAFNER *et al.*, 1976).

Duas características importantes do Parsalmide são a sua tolerância gástrica e a prevenção contra efeitos ulcerogênicos causados pela Aspirina e outros antiinflamatórios não esteroidais sem interferir com o seu efeito antiinflamatório (CARMINATI *et al.*, 1981; BERTACCINI *et al.*, 1979; BIANCHETTI *et al.*, 1982; MIRELLI *et al.*, 1976; VANDELLI *et al.*, 1981; WARNER *et al.*, 1999).

Tendo-se em vista estas características relevantes do ponto de vista terapêutico, vários análogos do Parsalmide foram sintetizados com a finalidade de se obter novos inibidores da COX (CALIENDO *et al.*, 2001).

Os compostos PA7, PA10 e PA31 (Figura IV) foram sintetizados pelos Profs. Drs Giuseppe Cirino e Vincenzo Santagada na Università Degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia. Estes compostos foram selecionados dentre trinta e nove moléculas por apresentarem bons resultados em testes farmacológicos.

No ensaio de agregação plaquetária os compostos PA7, PA10 e PA31 apresentaram IC50 de 48.1, 16.0 e 75 μ M respectivamente, a inibição da síntese de tromboxano *in vitro*, mostrou ser mais intensa para os compostos PA10 e PA31 chegando a 93.0% e 83.8% de inibição respectivamente e as inibições da síntese de tromboxano 1 hora, após a administração da droga PA7 (36.9%), PA10 (59.3%) e PA31 (29.5%) (PENNACHIN *et al.*, 2002).

Os compostos PA7 e PA10 inibiram cerca de 78% e 63% respectivamente o edema de pata induzido por carragenina. Em ensaios de inibição da COX *in vitro*, os compostos mostraram ser mais seletivos para COX-1, apresentando valores de IC₅₀ para COX-1 de 1.42 μ M, 18.0 μ M e para COX-2 de 8.35 μ M, 66.0 μ M para os compostos PA7 e PA10 respectivamente e por fim, o composto PA10 mostrou não causar danos gástricos e ainda preveniu danos causados por Indometacina (CALIENDO *et al.*, 2001).

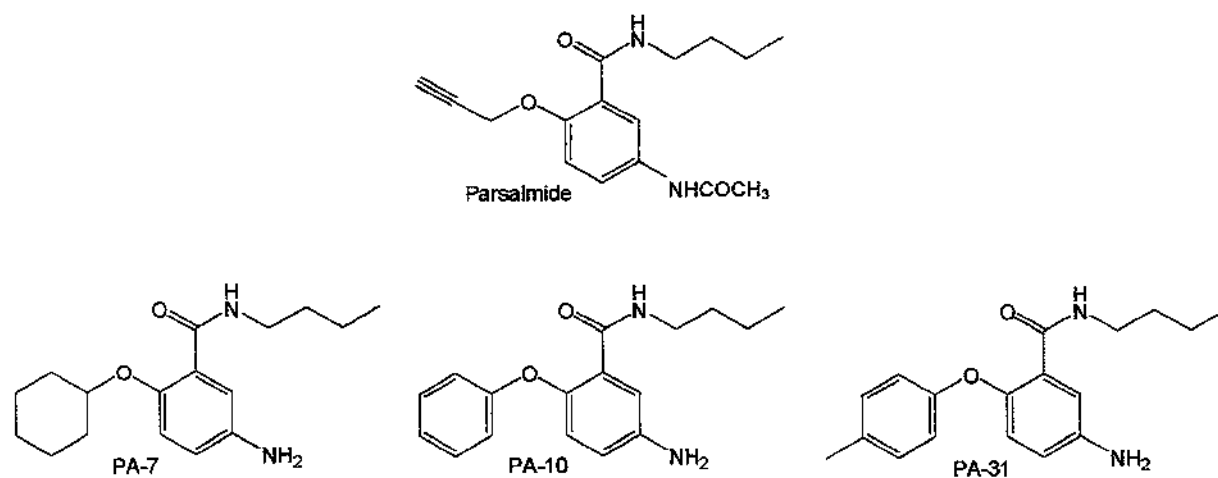


Figura IV- Estrutura dos compostos Parsalmide, PA7, PA10 e PA31.



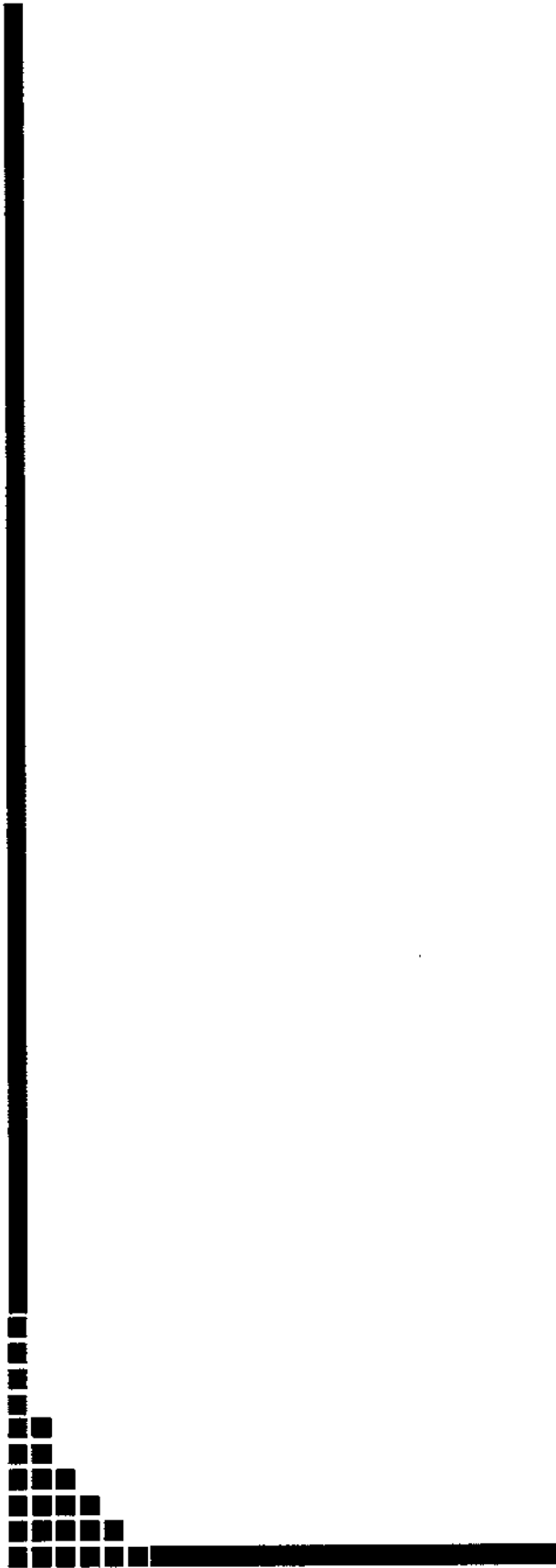
JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de um novo medicamento é um empreendimento de alto risco e requer um notável esforço humano e de recursos. A probabilidade de que um composto chegue a ser um novo medicamento é muito reduzida. Uma das principais causas da interrupção do desenvolvimento de um novo fármaco em fase clínica, é a existência de fatos inesperados que contribuem mais que a falta de eficácia terapêutica. O estudo do metabolismo que deveria ser parte do desenvolvimento pré-clínico, com freqüência é lembrado somente quando o fármaco entra em fase clínica. Assim, o metabolismo pode ser uma das razões pela qual, o desenvolvimento de um fármaco é interrompido, por causar efeitos adversos, consequência de diferente metabolismo entre indivíduos e interações com outros fármacos segundo RIPOLL (2004)².

Há mais de 15 anos, vários países têm usado testes de mutagenicidade no desenvolvimento de novas drogas, desde então órgãos reguladores como ICH (International Conference on Harmonisation), Comunidade Européia e FDA (Food and Drug Administration), recomendam ensaios que avaliem a mutação em genes bacterianos como o Teste de Ames (JENA *et al.*, 2002).

Dessa forma, é de extrema importância que testes de mutagenicidade e de metabolização *in vitro* sejam realizados na fase pré-clínica do desenvolvimento de novas drogas.

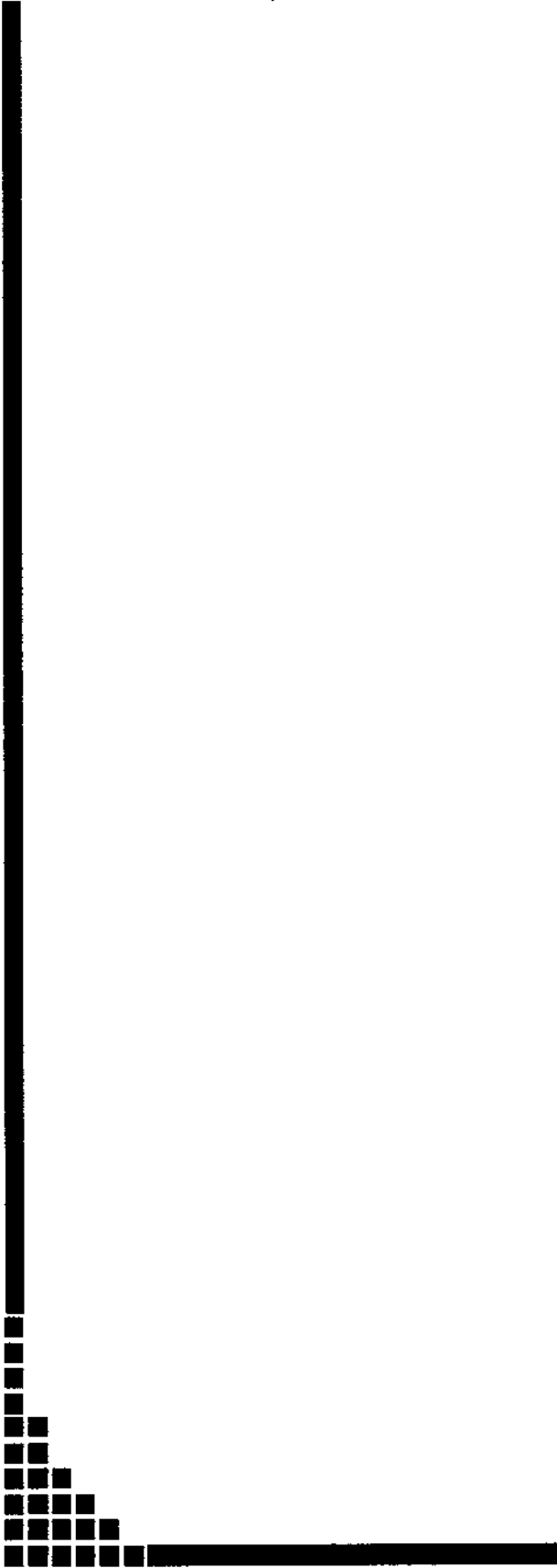
² <http://www.ranf.com/publi/mono/mono.html>



OBJETIVOS

Avaliar o potencial mutagênico dos compostos PA7, PA10 e PA31 através do Teste de Ames.

Identificar, caracterizar e quantificar os metabólitos formados no estágio de ativação metabólica aplicada ao Teste de Ames.



CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

ARTIGO PUBLICADO

In vitro mutagenicity of anti-inflammatory parsamide analogues PA7, PA10, and PA31 triggered by biotransformation into hydroxy derivatives

H.S. Cardoso^b, B. Bicalho^a, P. Genari^a, V. Santagada^c, G. Caliendo^c, E. Perissutti^c, J.L. Donato^b and G. De Nucci^{a*}

^aGaleno Research Unit, Latino Coelho st, 1301, Campinas, SP, 13087-010, Brazil

^bDepartment of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, P.O. Box 6111, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

^cDipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Napoli 'Federico II', Via Domenico Montesano 49, I-80131, Naples, Italy

*corresponding author: denucci@dglnet.com.br Jesuino Marcondes Machado AV., 415, Campinas, SP, 13092-320, Brazil. Phone: 55 (19) 3242-7133, Fax 55 (19) 3242-7439.

ABSTRACT

In this study, the mutagenicity of the anti-inflammatory parsalmide [5-amino-N-butyl-2-(2-propynyloxy)-benzamide] analogues PA7 [5-amino-N-butyl-2-cyclohexyloxy-benzamide], PA10 [5-amino-N-butyl-2-phenoxy-benzamide] and PA31 [5-amino-N-butyl-2-(p-tolyloxy)-benzamide] was determined by an Ames Salmonella assay. The experiments were performed by preincubating the compounds in the absence and presence of a post-mitochondrial fraction (S9) of rat liver homogenate from phenobarbital/ β -naphthoflavone treated rats. No mutagenic effect was observed after direct testing (no S9 added) in *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537. However, in the presence of S9, the test substances triggered mutagenic responses in strains TA100 and TA98. PA31 presented the strongest mutagenic potential. The reversion rates in the presence of PA31 were about 2-19 fold higher than spontaneous mutation rates. In the presence of PA7, the reversion increased 2-14 fold over spontaneous rates. While PA10 showed a relatively mild mutagenic potential, as the number of revertants did not exceed 2.5 times the number of spontaneous mutations. Mass spectrometric analysis of the *in vitro* biotransformation showed that S9 converted (%), regioselectively, PA7 (19%), PA10 (7%) and PA31 (12%) into hydroxy-derivatives.

KEY WORDS: Parsalmide analogues; Mutagenicity; Metabolites; Mass spectrometry.

1. INTRODUCTION

Among the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) that reached the public in recent decades, parsalmide [5-amino-N-butyl-2-(2-propynyloxy)-benzamide] (Figure 1) is outstanding for causing no ulcerogenous nor hemorrhagic effects at the gastroduodenal level [1,2]. This desirable characteristic from the therapeutic point of view has therefore inspired studies on parsalmide analogues as new NSAIDs candidates [3].

Several preclinical studies are required in the process of developing new drugs in order to establish the real pharmacological properties and toxicity potential of the test substance. These include assays to predict mutagenicity, carcinogenicity and metabolism pathways since biotransformation can affect the drug safety and efficacy due to the formation of therapeutically active or toxic metabolites [4,5].

Several *in vitro* models for studying drug mutagenicity and metabolism have been proposed [6-9]. The bacterial reverse mutagenicity assay on *Salmonella typhimurium* known as the Ames test [10] is the most popular short term test for assessing the mutagenic potential of xenobiotics. The Ames test is the preferred screening method for the assessment of the mutagenic activity of new synthesized drugs. Some authors have assumed that there is a strong correlation between the carcinogenic activity in an animal experiment and the mutagenic potential in the Ames test [11]. However, more recently Fetterman et al. [12] established that the relationship between mutagenic potency predictors and quantitative carcinogenicity is very weak.

Liver preparations and isolated hepatocytes are routinely used for the prediction of *in vitro* metabolism of drug candidates with the obvious advantage that they are easier to work with than whole animals [13, 14]. Liquid chromatography (LC) coupled with mass spectrometry (MS) is capable of generating rapid and accurate elucidation of the metabolites identity and plays a fundamental role in the development of new drugs [15-17].

A series of substituted benzamides has been synthesized as anti-inflammatory agents [3]. Two of the compounds, PA7 and PA10 presented very high anti-inflammatory activity in the carragenin-induced rat paw edema [3] and *in vitro* inhibition of human

platelet aggregation (data not shown). Since both compounds were devoid of gastric effect at the efficacious dose and also prevented indomethacin-induced gastric damage, they were used to lead the definition of a new leading structure with anti-inflammatory activity. In a new series of compounds, PA31 was selected as presenting the highest anti-inflammatory activity in carragenin-induced paw edema and platelet COX-1 inhibition (data not shown). In order to further the understanding of this new class of anti-inflammatory drugs, the mutagenic potential of these compounds were evaluated by the Ames test and LC-MS analysis was applied for the purpose of characterizing related genotoxic metabolites formed *in vitro* in the presence of rat liver S9.

2. CHEMISTRY

2.1. Synthesis of parsalimide analogue PA31

The general procedure used for the synthesis of the N-(n-butyl)-benzamide derivative PA31 is depicted in Scheme 1.

The reaction of the 2-chloro-5-nitrobenzoic acid **1** with n-butylamine performed in anhydrous dimethylformamide (DMF) in the presence of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole (DCC/HOBt) produced the corresponding intermediate **2**. Subsequent dissolution of the **2** in anhydrous dioxane and treatment with a solution of the appropriate alcohol and NaH in anhydrous dioxane gave the corresponding intermediate **3**. Reduction of the nitro group of intermediate **3**, carried out with sodium borohydride reagent, gave the corresponding intermediate **4**. Free base **4** was converted into the corresponding hydrochloride salt **5** by treatment with an excess of diethyl ether saturated with dry, gaseous HCl.

3. RESULTS

3.1. Mutagenicity assay

Substances PA7, PA10 and PA31 failed to elicit a mutagenic response in the Ames test after direct testing (no S9mix) in strains TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537. However, Table 1a and 1b show that in the presence of S9mix the test substances were converted into derivatives that induced at least a 2-fold increase in the number of revertant mutants of both TA98 and TA100. No increase in the revertant colonies was observed with strains TA102, TA1535 and TA1537. S9-activated PA7 and PA31 showed a dose-response effect in the dose range applied (31-250 µg/plate), although above 250 µg/plate, a general decrease was observed due to cell toxicity. Table 1a and 1b also show that S9-activated PA7 and PA31 presented distinct strain specific mutagenic tendencies.

Whereas the greatest number of revertant mutants of TA98 in the presence of S9-activated PA7 was almost 15-fold higher than the spontaneous mutation rate, while in the presence of S9-activated PA31 the maximum increment was not higher than 7-fold. On the other hand, the number of revertants of TA100 in the presence of S9-activated PA7 was about 5-fold the number of spontaneous mutations, whereas in the presence of S9-activated PA31 the reversion reached 19-fold the background level. In contrast, in the presence of S9-activated PA10 the number of reverted colonies did not exceed 2.5 times that of spontaneous mutations and no dose-response was observed.

3.2. MS characterization of PA metabolites

Figure 2 shows the total ion chromatograms related to the LC-MS analysis of the *in vitro* incubations of PA7, PA10 and PA31 with S9mix. Starting materials were identified by comparison of the retention times and mass spectra with data obtained by direct injection of standard solutions, and the corresponding metabolites were characterized by interpretation of mass spectrometric data. As the atmospheric pressure ionization source is relatively soft, the positive electrospray full-scan spectra (m/z 150–350) of all compounds showed the pseudo-molecular ions ($[M-H]^+$) in relatively high abundance

(Figure 3). Additionally, ions corresponding to sodium adducts ($[M-Na]^+$) were present in all spectra as the parent compound plus 23 mass units. The chromatographic peaks associated with metabolites of PA7, PA10 and PA31 eluted before the parent compounds, indicating that they were more hydrophilic products.

The corresponding mass spectra showed an increment of 16 mass units in both ($[M-H]^+$) and ($[M-Na]^+$), indicating that S9 converted PA7, PA10 and PA31 into hydroxy-derivatives. These were the only metabolites detected under the experimental conditions described. Percentual conversions (c%) by S9 of PA into hydroxy-products (PA-OH) depended on the substance structure, and in incubation conditions of a typical test dose of 31.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$, c% of PA7, PA10 and PA31 were about 19%, 7%, and 12%, respectively (Table 2). Chemical groups subjected to hydroxylation were characterized by the full-scan mass spectra patterns shown in Figure 3.

4. DISCUSSION

Worldwide regulatory commissions considering *in vitro* mutagenicity assays have intensively debated the Ames test in terms of result evaluation, but still a consensus on the acceptable criteria for a positive or negative result could not be reached [20-23]. Nevertheless, it is widely believed that a reproducible dose-response is necessary for a chemical to be classified as positive and that the use of a specific 2 or 3 fold-increase rule is in fact too conservative for bacterial strains possessing high spontaneous mutation values yet not sufficiently conservative for those strains with low spontaneous mutation values [20].

S9-activated PA7 and PA31 clearly presented both concentration-related base-pair substitution (TA100) and frameshift (TA98) reversion effects. Biotransformation of primary arylamines into N-hydroxy mutagenic species has been largely demonstrated [24-26].

However the hydroxylation of PA7 most likely occurred in the cyclohexane ring, as the ions of m/z 209 in both PA7 and PA7-OH spectra were probably due to an inter-ring hydrogen rearrangement leading to neutral losses of cyclohexene and cyclohexenol, respectively. This interpretation is consistent with the fact that cyclohexane serves as substrate for several cytochrome P450 isoforms [27,28]. On the other hand, as shown in Figure 5, the amine hydroxylation most likely occurred in the PA31 molecule, since in this case the positively charged mass fragment resulting from loss of H_2O (m/z 297) is relatively abundant (45%) and presented as a single product ion in the PA31-OH spectrum, probably due to an efficient *p*-oxygen-electron pair stabilization. It has been demonstrated that the enzymatic conjugation of arylamine N-oxidized metabolites can be of major concern due to their potential toxicity [25,29,30].

In regard to S9-activated PA10, no concentration-related increase in the number of revertant mutants was observed in the dose-range tested. Therefore, a clear mutagenic effect is not observed, but a discrete 2-fold increase in the number of revertant mutants relative to controls was obtained, indicating that mutagenic potential of PA10 needs further evaluation. Despite the PA10 and PA31 chemical resemblance, the mass spectrum analysis performed is in consistent with the biological assay results, since PA10-OH and PA31-OH showed completely different mass fragmentation patterns. In contrast to the primary amine hydroxylation of PA31, hydroxylation at the N-(*n*-butyl) amide moiety is shown for PA10-OH, as the ion of m/z 212 in both PA10 and PA10-OH spectra were most probably due to an acylium ion holding structural features fully shared by parent and product compounds.

The efficiency of the Ames test for the S9-activated PA10 can be affected by the fact that the percent conversions (c%) by S9 of PA10 into hydroxy-product (PA10-OH) in a typical test dose of 31.2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ was about 7%, while PA7 and PA31 were about 19% and 12%, respectively.

In conclusion, our results show that liver S9-cytochrome P450 enzymes regioselectively convert the parsalimide analogues PA7, PA10 and PA31 into hydroxy-derivatives, which proved to be unsafe metabolites when evaluated for mutagenic potential in the Ames test. The study herein reported may guide the definition of a new leading structure with anti-inflammatory activity that may allow for the design of new safer NSAIDs.

5. EXPERIMENTAL PROTOCOLS

5.1. Materials

The test substances PA7 and PA10 were synthesized as previously described [3] and supplied by Prof. V. Santagada (Pharmaceutical Chemistry Department, University of Naples, Italy). All other chemicals were purchased from Sigma and were used without further purification. The strains of *Salmonella typhimurium* were purchased from Xenometrix (San Diego, CA, USA).

5.2. Chemistry

5.2.1. 5-amino-N-butyl-2-(p-tolyloxy)-benzamide (PA31)

1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (14.7 g, 109 mmol) and dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (22.5 g, 109 mmol) were added to a solution of 2-chloro-5-nitrobenzoic acid **1** (20 g, 99.0 mmol) in anhydrous DMF (150 mL) at 0°C.

The resulting reaction mixture was stirred for 30 min, and then n-butylamine (10.8 mL, 109 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 0°C for 2 h and stored overnight at room temperature. N,N'-dicyclohexylurea (DCU) was filtered off, and the DMF was evaporated in a vacuum. The residue was dissolved in CH₂Cl₂, washed consecutively with brine, 1N NaOH, brine, 1N HCl and brine. The organic phase was dried over magnesium sulfate, filtered, concentrated in vacuum and, then the residue was purified by chromatography on a silica gel column (elution with diethyl ether/petroleum ether 7:3 v/v). Crystallization from diethyl ether/ethanol produced 19.6 g (77%) of pure **2** as a yellow solid, mp 134 °C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.46 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz, ArH), 8.19 (dd, 1H, *J* = 2.9 Hz, ArH), 7.59 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 6.23 (br, 1H, CONH), 3.48 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂NH), 1.89 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₂NH), 1.44 (m, 2H, *J* = 7.9 Hz, CH₂CH₃), 0.98 ppm (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₃). Next, a solution of sodium hydride (60% in mineral oil, 1.87 g, 78.0 mmol) in dry dioxane (100 mL) was added to p-cresol (5.57 g, 51.0 mmol) in an ice-water bath under a nitrogen atmosphere. After the evolution of hydrogen had ceased,

the mixture was stirred at 70°C for 2h. Then intermediate 2 (10.0 g, 39.0 mmol) in anhydrous dioxane (80 mL) was added dropwise, and the resulting reaction mixture was stirred at 70°C for 4h and then overnight at ambient temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in ethyl acetate and washed with brine.

The organic phase was dried over magnesium sulfate, filtered, concentrated in vacuum and the residue purified by chromatography on a silica gel column (elution with hexane/ethylacetate 8:2 v/v) to produce intermediate 3 (15 g, 89 %), mp 77°C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.12 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz, ArH), 8.15-8.13(dd, 1H, *J* = 2.9 Hz, ArH), 7.69 (br, 1H, CONH), 7.29 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.02 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 6.82 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 3.51 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂NH), 2.40 (s, 3H, CH₃), 1.61 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₂NH), 1.41 (m, 2H, *J* = 7.9 Hz, CH₂CH₃), 0.93 ppm (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₃), which was converted to 4 as follows: A suspension of (50 mL) of NaBH₄ 3.65 g (96.5 mmol) in water was added to a suspension of Pd/C (0.59 g) in 40 mL of water. The resulting reaction mixture was stirred at room temperature under nitrogen for 10 min. Then 3 (15.82 g, 48.2 mmol) in 150 mL of methanol was added dropwise, and the mixture was stirred for 30 min. The reaction mixture was filtered through a Celite. The solution was acidified with 1N HCl to remove the excess of NaBH₄. The acidified solution was adjusted to alkaline pH with 2N NaOH solution and the resulting suspension was extracted with diethyl ether. The organic phase was dried over magnesium sulfate, filtered, then evaporated to dryness to yield intermediate 4 as a brown oil (13.7 g, 95 %); ¹H-NMR data are reported as hydrochloride salt. Free base 4 (13 g) was dissolved in ethanol (100 mL), treated with an excess of diethyl ether saturated with dry, gaseous HCl. Recrystallization from diethyl ether/ethanol (8:2, v/v) provided 5 (13g, 89%) as a white solid; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.36(s, 1H, CONH), 7.81(d,1H, *J* = 2.9 Hz, ArH), 7.72 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.25 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 6.92 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 6.80 (d, 1H, *J* = 2.9Hz, ArH), 3.39 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂NH), 2.34 (s, 3H, CH₃), 1.50 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₂NH), 1.31 (m, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₃), 0.85 ppm (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₃). MS *m/z* 299.2 (M⁺).

5.3. Instrumentation

Absorbance measurements were performed on a Shimadzu model 1240 UV-Visible spectrophotometer. The HPLC system consisted of two Shimadzu LC10AD solvent pumps and a CTC Analytics PAL System autosampler. Mass spectra were obtained using Applied Biosystems API 4000 electrospray ionization (ESI) spectrometer.

5.4. Mutagenicity assay (Ames test)

Mutagenicity was assessed in the Ames Salmonella assay with strains TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537. Recipes for reagents and media were performed as described by Mortelmans and Zeiger [18]. Bacteria were grown in nutrient broth (25 g/L, #2 Oxoid) for 15 h, at 37°C, and 120 rpm, to give suspensions of 3×10^8 cells/mL ($A_{550nm} = 0.25$; McFarland scale, bioMérieux, Lyon, France). Test compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to give solutions of 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.2 mg/mL, 3.1 mg/mL and 1.55 mg/mL. Assays without metabolic activation (no S9) were performed mixing 20 μ L of each test substance solution with 500 μ L of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 100 μ L of bacteria suspension. After 30 min of incubation, 2 mL of molten top agar supplemented with traces of histine and biotine (50 μ M each, final concentration) were added, rapidly vortexed and poured on GM agar plates. As the top agar hardened, plates were inverted and incubated for 48 h, at 37°C.

Assays with *in vitro* metabolism were similarly performed replacing phosphate buffer by an equal volume of S9mix (10% v/v S9, 4.7 mM NADP, 6 mM D-glucose-6-phosphate, 19 mM MgCl₂, 36 mM KCl, phosphate buffer 0.1 M pH 7.4). Rat liver S9 was prepared as described by Ames et al. [19], except that rats were treated for 3 consecutive days with intraperitoneal injections of phenobarbital (100 mg/Kg) and β -naphthoflavona (80 mg/Kg). Positive controls were performed with strain-specific substances largely used in the Ames assay [18]. Negative controls were performed with plain DMSO. Experiments were run in triplicate. The results were recorded as mean revertant colonies per plate \pm the (%)SD and as the ratio (R) of the number of revertant colonies per test plate and negative control. A positive response for mutagenicity was defined as a reproducible 2-fold increase of revertants with a dose-response relationship [20-23].

5.5. *In vitro* biotransformation

Reactions were performed based on the mutagenicity assay procedure described above. Test compounds were dissolved in DMSO to give solutions of 3 mg/mL, 1.5 mg/mL and 0.3 mg/mL. Aliquots (20 μ L) from these were added to bacteria suspensions (100 μ L, 3×10^8 cells/mL) and S9mix (500 μ L). The mixtures were incubated at room temperature (25°C) for 30 min, and then extracted with 3 mL of ethyl ether (vortex, 60 s). The organic phases were separated, solvents evaporated under N₂ and final residues suspended in CH₃CN-H₂O/0.1% formic acid (1:1) for LC-MS analysis. Control reactions were performed using a cofactor mix devoid of S9.

5.6. HPLC-MS analysis

Chromatographic separations were carried out on a Genesis C8 column (120 \times 4.6 mm I.D., 4 μ particle size, Genesis, UK). C8 guard column (4 \times 4 mm I.D., Genesis) was used to protect the analytical column. The mobile phase for the analysis of the test substances and their metabolites consisted of CH₃CN-H₂O (45:55, v/v) acidified with 0.1% formic acid, at a flow rate of 1 mL/min. The autosampler was maintained at 8°C and was set up to make a 10 μ L sample injection. The MS system was operated with the ESI interface in the positive ion mode in the 150 to 350 Da range. The source block temperature was 450°C. The ionization energy was 4500 V. Nitrogen was used as drying, nebulizing and collision gases. Conversion rate (c%) was calculated as $(M \times 100)/(A + M)$, where A = chromatographic peak area of the starting material and M = chromatographic peak area of the metabolite.

REFERENCES

- [1] G. Bertaccini, E. Molina, G. Coruzzie, M. Chiavarini, *Farmaco* 34 (1979) 481-491.
- [2] A. Bianchetti, A. Lavezzo, P. Carminatti, *J. Pharm. Pharmacol.* 34 (1982) 51-53.
- [3] G. Caliendo, V. Santagada, E. Perissutti, E. Severino, F. Fiorino, T.D. Warner, J.L. Wallace, D.R. Ifa, E. Antunes, G. Cirino, G. De Nucci, *Eur. J. Med. Chem.* 36 (2001) 517-530.
- [4] P.H. Rooney, C. Telfer, M.C. McFadyen, W.T. Melvin, G.I. Murray, *Curr. Cancer Drug Targets* 4 (2004) 257-265.
- [5] D.P. Williams, B.K. Park, *Drug Discov Today* 8 (2003) 1044-1050.
- [6] D. Purves, C. Harvey, D. Tweats, C.E. Lumley, *Mutagenesis* 10 (1995) 297-312.
- [7] ICH Guidance for Industry S2B Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1997.
- [8] K. Venkatakrisnan, L.L. Von Moltke, D.J. Greenblatt, *J. Clin. Pharmacol.* 41 (2001) 1149-1179.
- [9] R. Zuber, E. Anzenbacherova, P. Anzenbacher, *J. Cell. Mol. Med.* 6 (2002) 189-198.
- [10] D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.* 113 (1983) 173-215.
- [11] I.F. Purchase, E. Longstaff, J. Ashby, J.A. Styles, D. Anderson, P.A. Lefevre, F.R. Westwood, *Nature* 264 (1976) 624-627.
- [12] B.A. Fetterman, B.S. Kim, B.H. Margolin, J.S. Schildcrout, M.G. Smith, S.M. Wagner, E. Zeiger, *Environ Mol Mutagen.* 29 (1997) 312-322.
- [13] M. Bertrand, P. Jackson, B. Walther, *Eur J Pharm Sci.* 11 (2000) 61-72.
- [14] G. Fabre, J. Combalbert, Y. Berger, J.P. Cano, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 15 (1990) 165-171.

- [15] A.S. Pereira, J.L. Donato, G. De Nucci, *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 63-69.
- [16] P.O. Edlund, P. Baranczewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 1079-1090.
- [17] R. Kostianen, T. Kotiaho, T. Kuورانne, S. Auriola, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 357-372.
- [18] K. Mortelmans, E. Zeiger, *Mutat. Res.* 455 (2000) 29-60.
- [19] B.N. Ames, W.E. Durston, E. Yamasaki, F.D. Lee, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70 (1973) 2281-2285.
- [20] D. Gatehouse, S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt, E. Zeiger, *Mutat. Res.*, 312 (1994) 217-233.
- [21] ICH Guideline for Industry S2A Genotoxicity: Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals, International Conference on Harmonization on Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996.
- [22] OECD (Organization of Economic Cooperation and Development), Guideline for testing of chemicals, guideline 471: Bacterial reverse mutation test, Paris: Organization of Economic Cooperation and Development, 1997.
- [23] G.B. Jena, C.L. Kaul, P. Ramarao, *Indian J. Pharmacol.* 34 (2002) 86-99.
- [24] J.C. Sasaki, R.S. Fellers, M.E. Colvin, *Mutat. Res.* 506-507 (2002) 79-89.
- [25] E. Banoglu, *Curr. Drug Metab.* 1 (2000) 1-30.
- [26] R.S. King, C.H. Teitel, J.G. Shaddock, D.A. Casciano, F.F. Kadlubar, *Cancer Lett* 143 (1999) 167-171.
- [27] T.I. Senler, W.L. Dean, L.F. Murray, J.L. Wittliff, *Biochem. J.*, 227 (1985) 379-387.
- [28] A.D.N. Vaz, S.J. Pernecky, G.M. Raner, M.J. Coon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 4644-4648.
- [29] E.G. Snyderwine, M. Venugopal, M. Yu, *Mutat. Res.* 506-507 (2002) 145-152.
- [30] P.J. O'Brien, B.F. Hales, P.D. Josephy, A. Castonguay, Y. Yamazoe, F.P. Guengerich, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74 (1996) 565-571.

Table 1a. Mutagenic activity of parsalimide analogues in the Ames test using the TA98 strain.

Table 1b. Mutagenic activity of parsalimide analogues in the Ames test using the TA100 strain.

Table 2. S9-mix conversion of parsalimide analogues into hydroxy-derivatives.

Figure 1. Parsalimide and parsalimide analogues PA7, PA10 and PA31.

Figure 2. Total ion chromatograms of ethyl ether extracts of Ames test-metabolic activation medium incubated with (A) PA7, (B) PA10 and (C) PA31 for 30 min.

Figure 3. ESI full-scan (m/z 150-350 Da) mass spectra of PA7, PA10, PA31 and corresponding S9-catalyzed hydroxy-derivatives.

Figure 4. Mass fragmentation mechanisms suggested for PA7 and PA7-OH.

Figure 5. Mass fragmentation mechanisms suggested for PA31 and PA31-OH.

Figure 6. Mass fragmentation mechanisms suggested for PA10 and PA10-OH.

Scheme 1. Synthetic procedure of compound PA31.

Table 1a

| Substance | Dose µg/plate | S9mix | N ^o Revertant colonies/plate | | | Mean N ^o revertants | SD (%) | Ratio test/control |
|-----------|------------------|-------|--|------|------|-----------------------------------|-----------|-----------------------|
| DMSO | | + | 23 | 25 | 26 | 25 | 6 | |
| PA7 | 1000 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 0.0 ^a |
| | 500 | + | 5 | 1 | 5 | 4 | 63 | 0.1 ^a |
| | 250 | + | 508 | 348 | 234 | 363 | 38 | 14.7 |
| | 125 | + | 260 | 246 | 244 | 250 | 3 | 10.1 |
| | 62.5 | + | 213 | 216 | 183 | 204 | 9 | 8.3 |
| 2AA | 5 | + | 3080 | 4156 | 3380 | 3539 | 16 | 143.5 |
| DMSO | | + | 23 | 25 | 26 | 25 | 6 | |
| PA10 | 1000 | + | 0 | 0 | 6 | 2 | 173 | 0.0 ^a |
| | 500 | + | 31 | 5 | 2 | 13 | 126 | 0.5 ^a |
| | 250 | + | 40 | 25 | 15 | 27 | 47 | 1.1 ^b |
| | 125 | + | 57 | 64 | 60 | 60 | 6 | 2.4 |
| | 62.5 | + | 63 | 53 | 69 | 62 | 13 | 2.5 |
| 2AA | 5 | + | 3080 | 4156 | 3380 | 3539 | 16 | 143.5 |
| DMSO | | + | 32 | 25 | 17 | 25 | 30 | |
| PA31 | 1000 | + | 143 | 123 | 114 | 127 | 12 | 5.1 ^b |
| | 500 | + | 186 | 172 | 169 | 176 | 5 | 7.1 |
| | 250 | + | 102 | 115 | 143 | 120 | 17 | 4.9 |
| | 125 | + | 111 | 128 | 109 | 116 | 9 | 4.7 |
| | 62.5 | + | 61 | 66 | 85 | 71 | 18 | 2.9 |
| 2AA | 5 | + | 702 | 695 | 790 | 729 | 7 | 29.6 |

^aToxic: complete disappearance of background lawn. ^bModerately toxic: partial disappearance of background lawn.

Table 1b

| Substance | Dose µg/plate | S9mix | N° Revertant colonies/plate | | | Mean N° revertants | SD (%) | Ratio test/control |
|-----------|------------------|-------|--------------------------------|------|------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| DMSO | | + | 240 | 239 | 210 | 230 | 7 | |
| PA7 | 500 | + | 666 | 757 | 673 | 699 | 7 | 3.0 ^b |
| | 250 | + | 754 | 875 | 788 | 806 | 8 | 3.5 ^b |
| | 125 | + | 1306 | 1244 | 1176 | 1242 | 5 | 5.4 |
| | 62.5 | + | 975 | 722 | 825 | 841 | 15 | 3.7 |
| | 31.25 | + | 566 | 615 | 481 | 554 | 12 | 2.4 |
| 2AA | 5 | + | 3712 | 4148 | 4468 | 4109 | 9 | 17.9 |
| DMSO | | + | 240 | 239 | 210 | 230 | 7 | |
| PA10 | 500 | + | 537 | 573 | 470 | 527 | 10 | 2.3 |
| | 250 | + | 575 | 449 | 553 | 526 | 13 | 2.3 |
| | 125 | + | 560 | 501 | 547 | 536 | 6 | 2.3 |
| | 62.5 | + | 514 | 471 | 538 | 508 | 7 | 2.2 |
| | 31.25 | + | 479 | 604 | 458 | 514 | 15 | 2.2 |
| 2AA | 5 | + | 4148 | 4468 | 3712 | 4109 | 9 | 17.9 |
| DMSO | | + | 96 | 87 | 78 | 87.0 | 10 | |
| PA31 | 500 | + | 1399 | 1539 | 1631 | 1523 | 8 | 17.5 ^b |
| | 250 | + | 1737 | 1757 | 1563 | 1686 | 6 | 19.4 |
| | 125 | + | 1132 | 1345 | 1331 | 1269 | 9 | 14.6 |
| | 62.5 | + | 1282 | 994 | 1157 | 1144 | 13 | 13.2 |
| | 31.25 | + | 608 | 623 | 674 | 635 | 5 | 7.3 |
| 2AA | 5 | | 1180 | 1379 | 1408 | 1322 | 9 | 15.2 |

^aToxic: complete disappearance of background lawn. ^bModerately toxic: partial disappearance of background lawn.

Table 2

| Sample | dose/plate | t (min) ^b | TIC Area ^a | | c% ^c |
|--------|------------|----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|
| | | | PA | PA-OH | |
| PA-7 | 31.25 | 30 | 7.24×10^9 | 1.70×10^9 | 19 |
| PA-10 | 31.25 | 30 | 8.91×10^9 | 6.84×10^8 | 7 |
| PA-31 | 31.25 | 30 | 3.36×10^9 | 4.45×10^8 | 12 |

^aTotal ion chromatographic peak areas integrated as full scan spectra (m/z 150-350). ^bTime (min) of incubation with S9-mix. ^cConversion calculated as $(M \times 100)/(A + M)$.

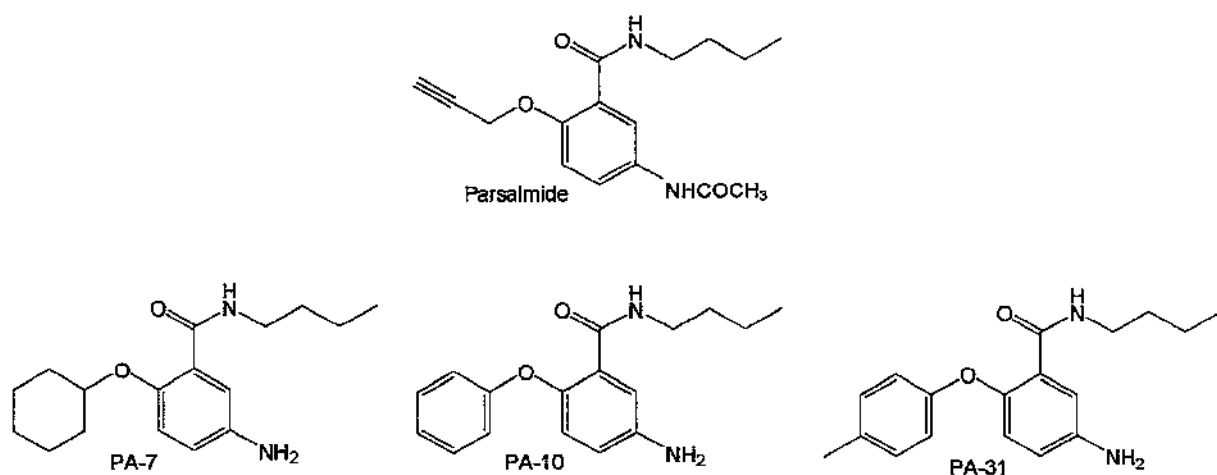
FIGURE 1

FIGURE 2

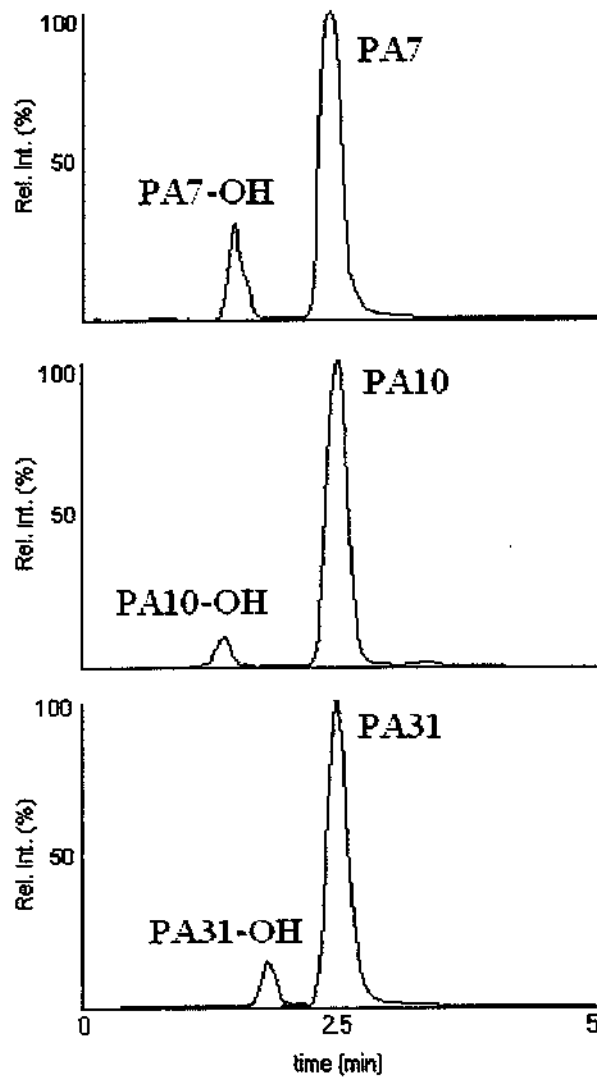


FIGURE 3

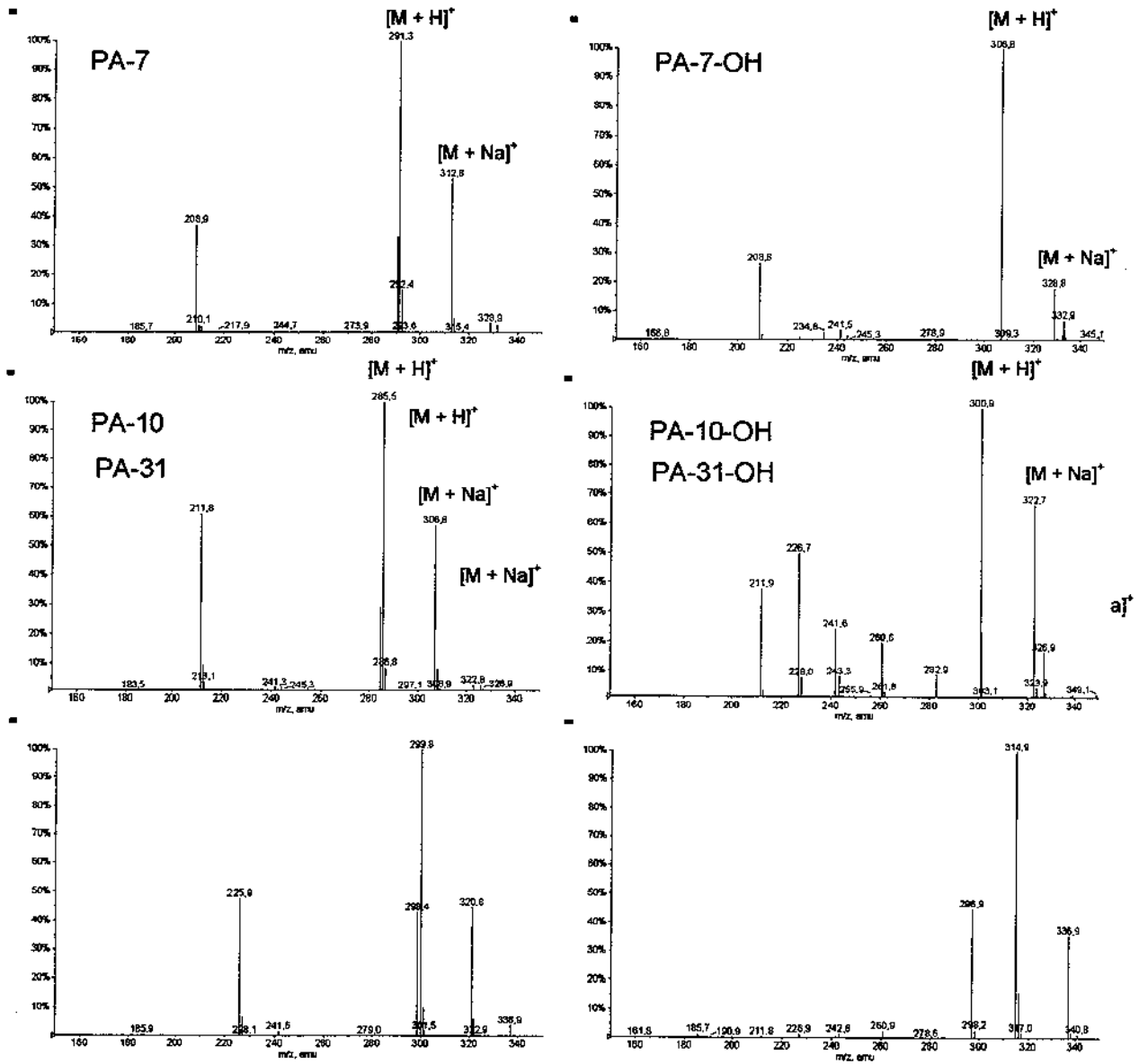


FIGURE 4

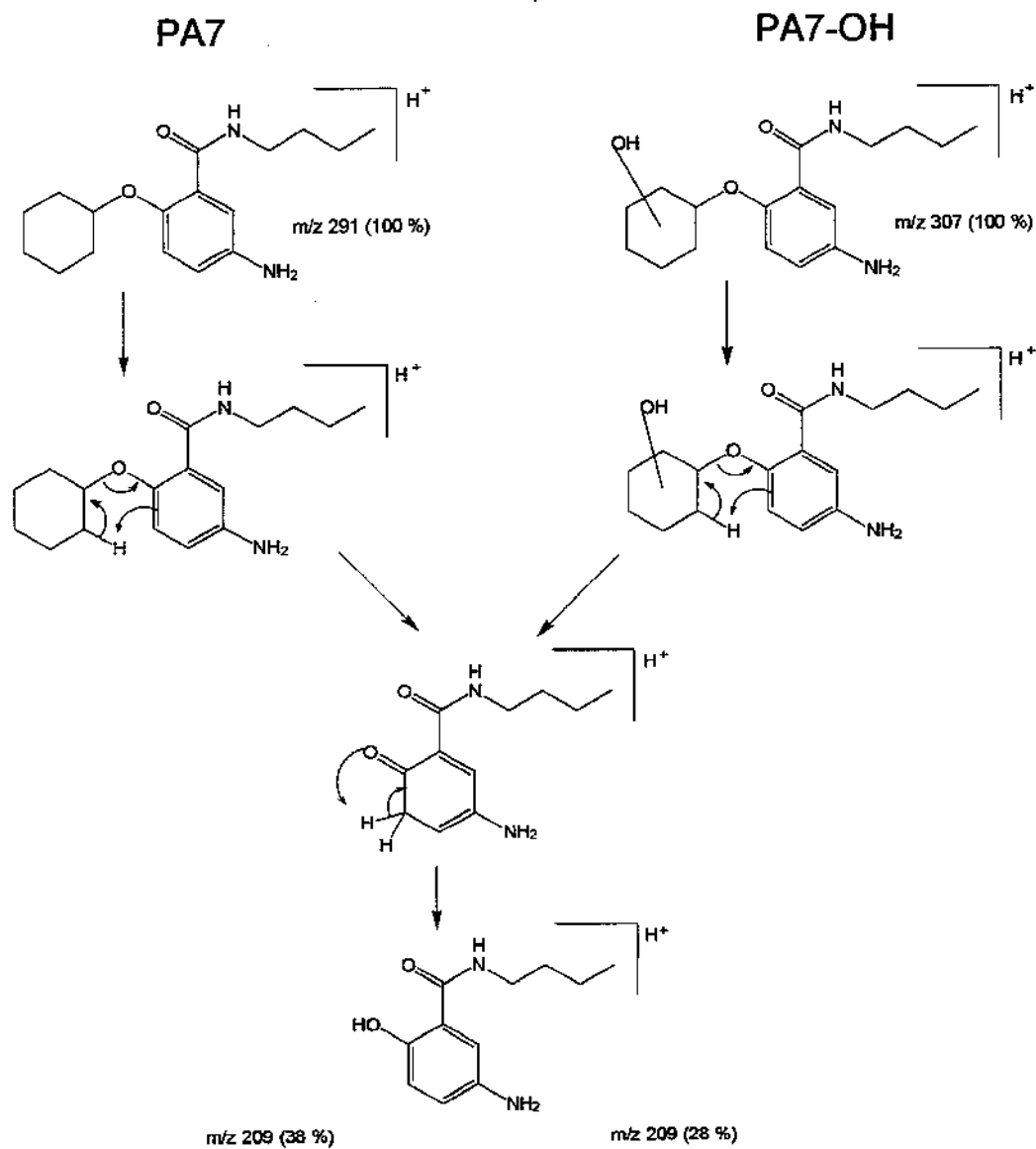


FIGURE 5

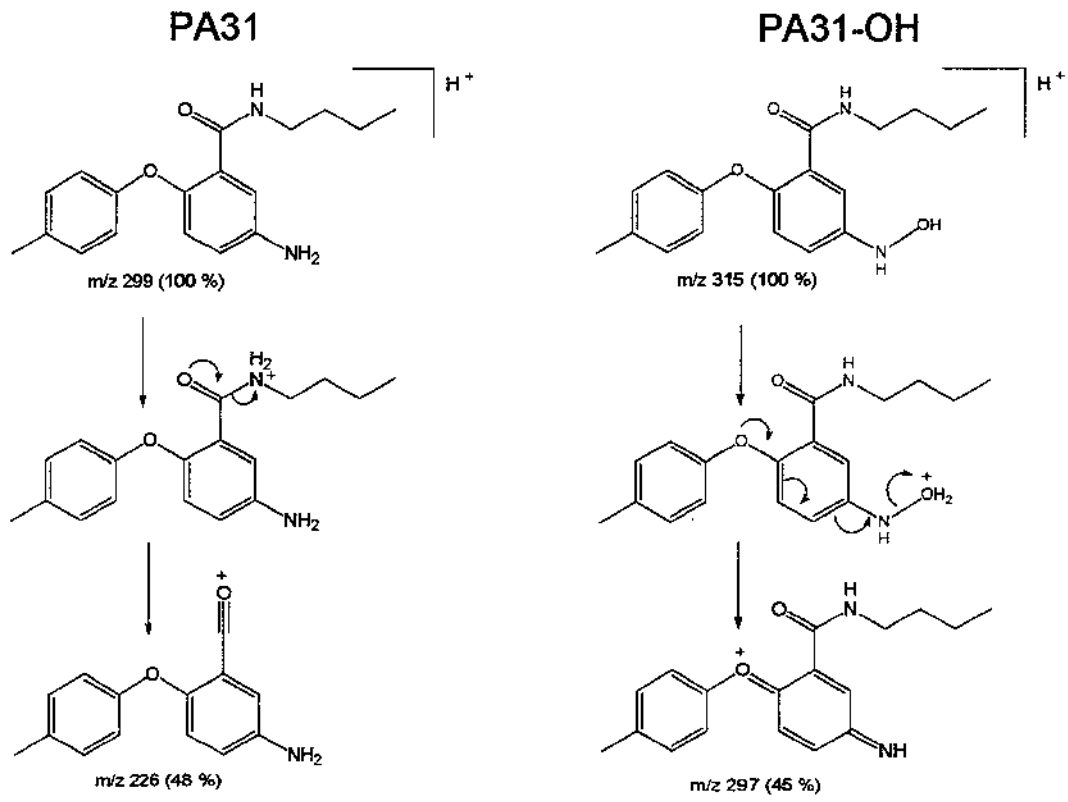
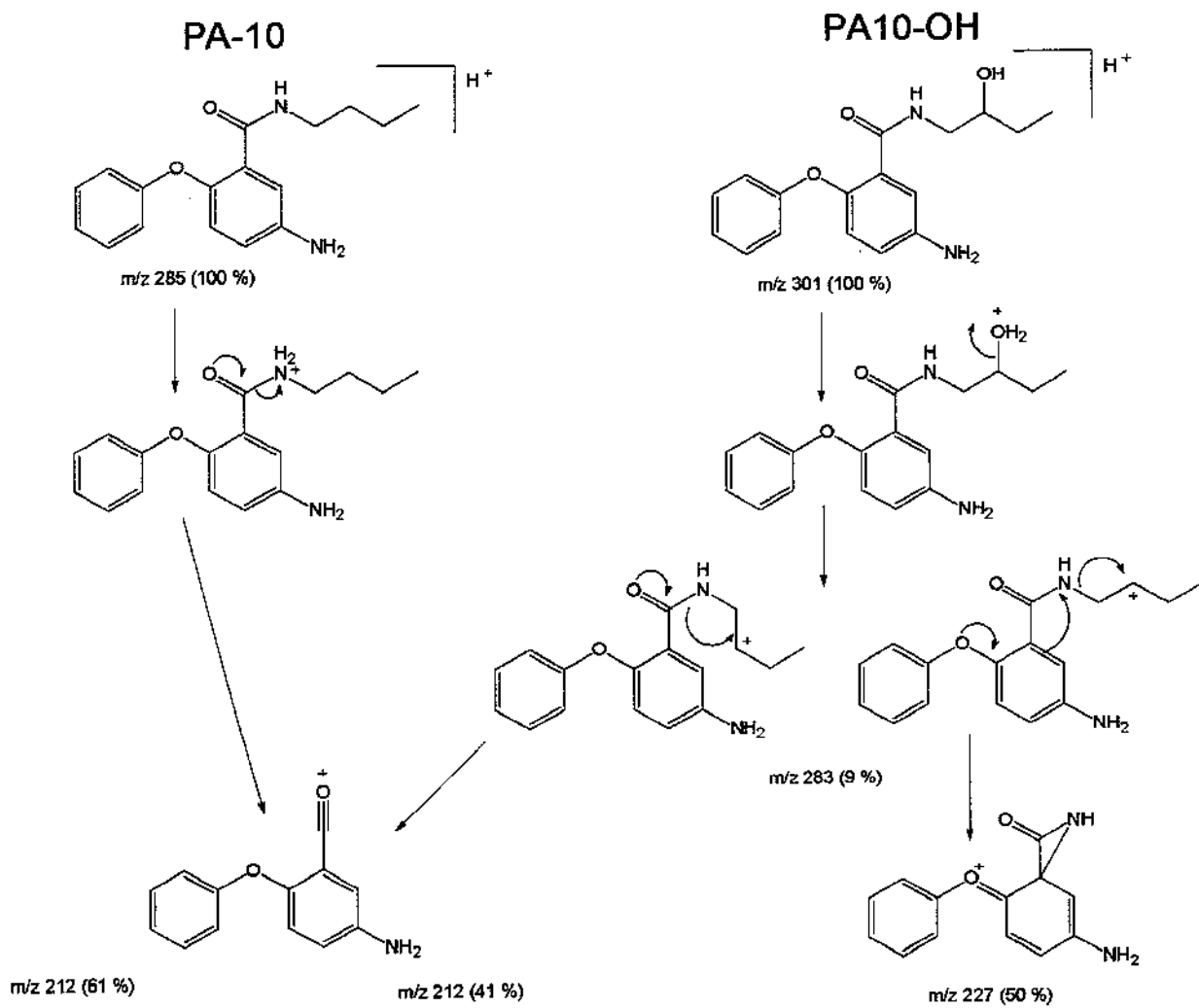
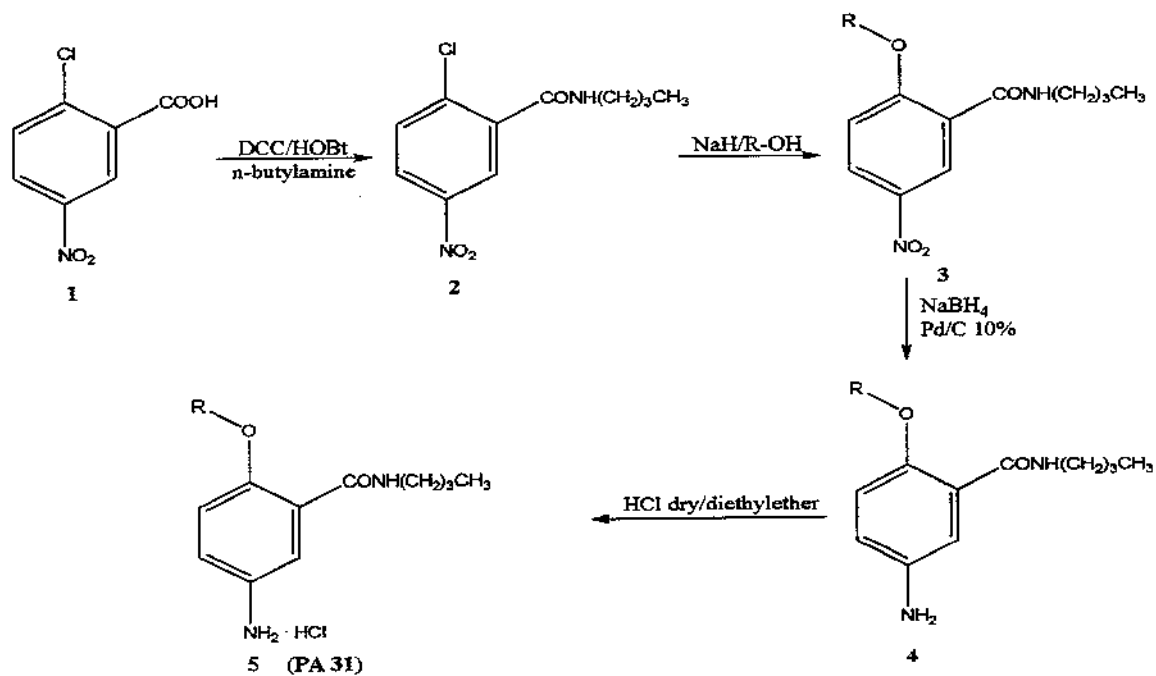


FIGURE 6

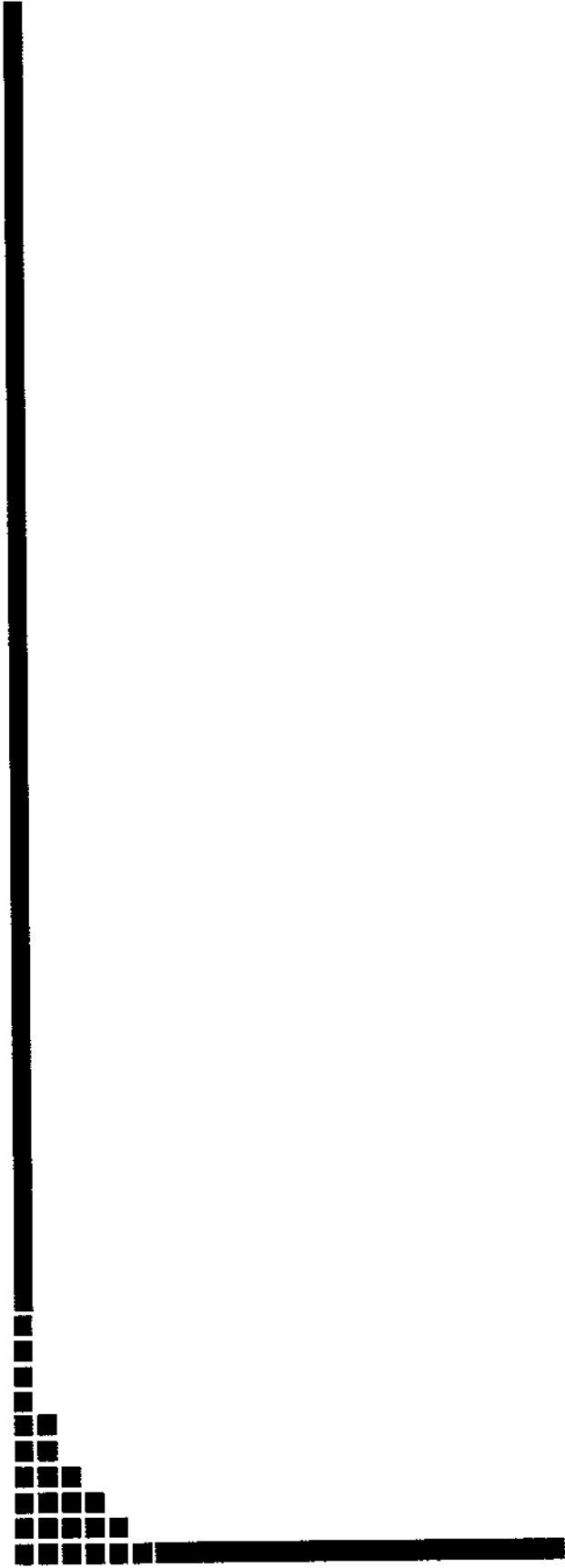


SCHEME 1

SYNTHETIC PROCEDURE OF COMPOUND 5 (PA 31)



R = 4-methylphenyl-



DISCUSSÃO

Por todo o mundo comissões regulatórias, considerando ensaios de mutagenicidade *in vitro*, têm debatido intensivamente o Teste de Ames em relação à interpretação dos resultados, mas um consenso sobre o critério de aceitação para um resultado positivo ou negativo ainda não pode ser alcançado (GATEHOUSE *et al.*, 1994; ICH..., 1996; OECD..., 1997; JENA *et al.*, 2002).

Todavia, acredita-se que seja necessária a reprodução de uma dose-resposta para uma substância ser considerada como positiva e que um aumento de 2-3 vezes também é de fato conservativo para cepas bacterianas que possuem altos valores de mutação espontânea, porém não é suficientemente conservativa para aquelas cepas com baixos valores de mutação espontânea (GATEHOUSE *et al.*, 1994).

As moléculas PA7 e PA31 ativadas pela fração S9 mostraram claramente que induzem efeitos de reversão como substituição de par de bases (TA100) e deslocamento do quadro de leitura (TA98) relacionado à concentração. A biotransformação de arilaminas primárias em espécies mutagênicas N-hidroxiladas tem sido amplamente demonstrada (SASAKI *et al.*, 2002; BANOGLU, 2000; KING *et al.*, 1999).

Entretanto a hidroxilação da molécula PA7 ocorre mais comumente no anel ciclohexano, visto que íons de 209 m/z ocorrem em ambos os espectros (PA7 e PA7-OH) provavelmente devido a um rearranjo do hidrogênio inter-anel conduzindo a perdas neutras de ciclohexeno e ciclohexenol, respectivamente. Essa interpretação é consistente com o fato que ciclohexano serve como substrato para diversas isoformas da citocromo P450 (SENLER *et al.*, 1985; VAZ *et al.*, 1996).

Por outro lado, como mostrado na figura 5, (Capítulo I) a hidroxilação da amina ocorre mais comumente na molécula PA31, visto que nesse caso o fragmento de massa carregado positivamente resultante da perda de H₂O (297 m/z) é relativamente abundante (45%) e apresentou como produto, um único íon no espectro da PA31-OH, provavelmente devido a uma eficiente estabilização do par de elétrons originado do *p*-oxigênio.

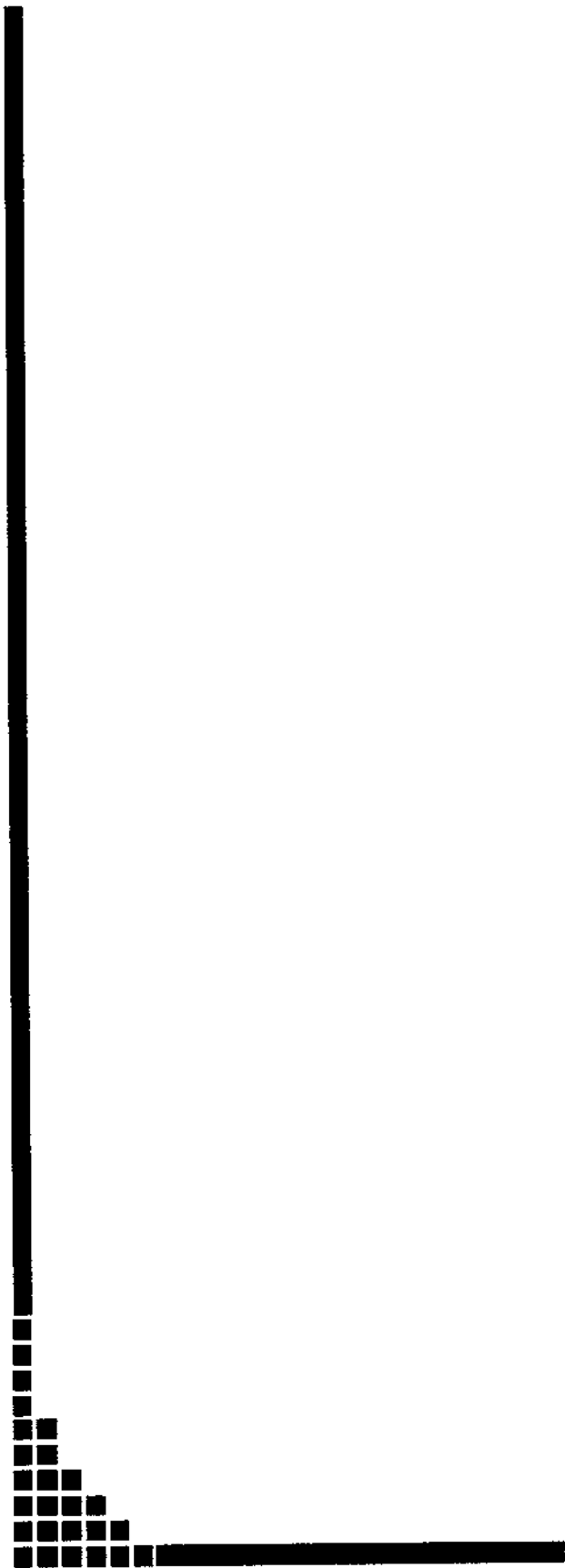
Demonstrou-se que a conjugação enzimática de metabólitos arilamina N-oxidados podem ser de maior interesse devido ao seu potencial de toxicidade (BANOGLU, 2000; SNYDERWINE *et al.*, 2002; O'BRIEN *et al.*, 1996).

Quanto à ativação da molécula PA10, nenhum aumento no número de revertentes mutantes em relação à concentração foi observado na faixa de doses utilizada no teste. Consequentemente um efeito mutagênico muito claro não foi observado, mas um discreto aumento de 2 vezes o número de mutantes revertentes relativos ao controle foi observado, indicando que o potencial mutagênico da molécula PA10 necessita de futura avaliação.

A pesar da semelhança química entre as moléculas PA10 e PA31, a análise realizada do espectro de massa está de acordo com os resultados dos ensaios biológicos, visto que PA10-OH e PA31-OH mostraram padrões de fragmentação de massa completamente diferentes.

Em contraste à hidroxilação da amina primária da molécula PA31, a hidroxilação na porção N-(n-butil) amida é mostrada para PA10-OH, visto que ocorre um íon de 212 m/z em ambos os espectros (PA10 e PA10-OH) mais provavelmente devido a um íon acilium carregando características estruturais inteiramente compartilhadas pela droga (PA10) e o composto produzido (PA10-OH).

A eficiência do Teste de Ames para avaliação da molécula PA10 ativada pela fração S9 pode ser afetada pelo fato de que a porcentagem de conversão (c%) da molécula PA10 no produto hidroxilado (PA10-OH) usando-se uma dose típica de 31,2 µg/placa foi cerca de 7%, enquanto que para as moléculas PA7 e PA31 foi 19% e 12% respectivamente.



CONCLUSÃO

Finalmente, nossos resultados mostraram que as enzimas hepáticas citocromo P450 encontradas na fração S9 convertem regioseletivamente os análogos do Parsalmide PA7, PA10 e PA31 em derivados hidroxilados, os quais demonstraram ser metabólitos inseguros quando avaliados através do Teste de Ames quanto ao potencial mutagênico. As informações contidas nesse estudo podem guiar a definição de uma nova estrutura líder com atividade antiinflamatória que permita projetar novos antiinflamatórios não esteroidais mais seguros.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

ALVARES, A. P.; PRAT, W. B. **Principles of Drug Action**. 3 ed. New York Editorial Churchill Livingstone, 1990.

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 70(3): 782-6, 1973a.

AMES, B. N.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 70(8): 2281-5, 1973b.

AMES, B. N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutat Res**, 31(6): 347-64, 1975.

AMES, B. N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. **Science**, 204(4393): 587-93, 1979.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 15 jun. 2005.

BANOGLU, E. Current status of the cytosolic sulfotransferases in the metabolic activation of promutagens and procarcinogens. **Curr Drug Metab**, 1(1): 1-30, 2000.

BERTACCINI, G.; MOLINA, E.; CORUZZIE, G.; CHIAVARINI, M. Effects of parsalmide on in vivo and in vitro gastric secretion. **Farmaco [Prat]**, 34: 481-91, 1979.

BIANCHETTI, A.; LAVEZZO, A.; CARMINATI, P. The non-steroidal anti-inflammatory agent parsalmide prevents aspirin- induced H⁺ back diffusion from the gastric lumen of the rat. **J Pharm Pharmacol**, 34: 51-3, 1982.

BRANDON, E. F.; RAAP, C. D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicol Appl Pharmacol**, 189(3): 233-46, 2003.

CALIENDO, G.; SANTAGADA, V.; PERISSUTTI, E.; SEVERINO, B.; FIORINO, F.; WARNER, T. D. *et al.* Synthesis of substituted benzamides as anti-inflammatory agents that inhibit preferentially cyclooxygenase 1 but do not cause gastric damage. **Eur J Med Chem**, 36: 517-30, 2001.

CARMINATI, P.; LAVEZZO, A.; MANZONI, L.; GIUDICE, A.; AUREGGI, G.; BIANCHETTI, A. Antiulcer effect of the non-steroidal anti-inflammatory agent, parsalimide, in rats. **Farmaco [Prat]**, 36: 58-72, 1981.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S. *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99 (21): 13926-31, 2002.

CHIANG, J. Y.; KIMMEL, R.; WEINBERGER, C.; STROUP, D. Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. **J Biol Chem**, 275(15): 10918-24, 2000.

CLARKE, N. J.; RINDGEN, D.; KORFMACHER, W. A.; COX, K. A. Systematic LC/MS metabolite identification in drug discovery. **Anal Chem**, 73(15): 430A-439A, 2001.

CONE, E. J.; DARWIN, W. D.; BUCHWALD, W. F. Assay for codeine, morphine and ten potential urinary metabolites by gas chromatography-mass fragmentography. **J Chromatogr**, 275(2): 307-18, 1983.

CONNEY, A. H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Res**, 42(12): 4875-917, 1982.

COON, M. J.; DING, X. X.; PERNECKY, S. J.; VAZ, A. D. Cytochrome P450: progress and predictions. **FASEB J**, 6(2): 669-73, 1992.

CRESTANI, M.; STROUP, D.; CHIANG, J. Y. Hormonal regulation of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7). **J Lipid Res**, 36(11): 2419-32, 1995.

CZEKAJ, P. Phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 genes. **Acta Biochim Pol**, 47(4): 1093-105, 2000.

ELLIOTT, B. M.; COMBES, R. D.; ELCOMBE, C. R.; GATEHOUSE, D. G.; GIBSON, G. G.; MACKAY, J. M. *et al.* Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro genotoxicity assays. **Mutagenesis**, 7(3): 175-7, 1992.

FARNETI, P.; COLOMBO, I. Controlled clinical trial of parsalmide in patients with subacute and chronic arthro-neuro-mypathies. **Minerva Med**, 67: 3377-82, 1976.

FETTERMAN, B. A.; KIM, B. S.; MARGOLIN, B. H.; SCHILDCROUT, J. S.; SMITH, M. G.; WAGNER, M. G. *et al.* Predicting rodent carcinogenicity from mutagenic potency measured in the ames salmonella assay. **Environ Mol Mutagen**, 29(3): 312-322, 1997.

FUHR, U. Induction of drug metabolising enzymes: pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. **Clin Pharmacokinet**, 38(6): 493-504, 2000.

GATEHOUSE, D.; HAWORTH, S.; CEBULA, T.; GOCKE, E.; KIER, L.; MATSUSHIMA, T. *et al.* Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutat Res**, 312(3): 217-33, 1994.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. **Modern Genetic Analysis**. 2 ed. New York. Freeman, W. H. 1999, p. 736.

GUPTA, R. A.; TEJADA, L. V.; TONG, B. J.; DAS, S. K.; MORROW, J. D.; DEY, S. K. *et al.* Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. **Cancer Res**, 63(5): 906-11, 2003.

HO, C. S.; LAM, C. W. K.; CHAM, M. H. M.; CHEUNG, R. C. K.; LAW, L. K.; LIT, L. C. W. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **Clin Biochem Rev**, 24: 3-12, 2003.

HOLICK, M. F. McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D-new horizons for the 21st century. **Am J Clin Nutr**, 60(4): 619-30, 1994.

HONKAKOSKI, P.; NEGISHI, M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. **Biochem J**, 347(Pt 2): 321-37, 2000.

HUNT, M. C.; YANG, Y. Z.; EGGERTSEN, G.; CARNEHEIM, C. M.; GAFVELS, M.; EINARSSON, C. *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) regulates bile acid biosynthesis. **J Biol Chem**, 275(37): 28947-53, 2000.

ICH Guideline for Industry S2A Genotoxicity: Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals, International Conference on Harmonization on Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. **Mutat Res**, 482(1-2): 11-9, 2001.

ISONO, K.; YOURNO, J. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 71: 1612-17, 1974.

JACKSON, L. M.; HAWKEY, C. J. COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs: do they really offer any advantages? **Drugs**, 59: 1207-16, 2000.

JANOWSKI, B. A.; GROGAN, M. J.; JONES, S. A.; WISELY, G. B.; KLIEWER, S. A.; COREY, E. J. *et al.* Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96(1): 266-71, 1999.

JENA, G. B.; KAUL, C. L.; RAMARAO, P. Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. **Indian J Pharmacol**, 34: 86-99, 2002.

JONES, M. K.; WANG, H.; PESKAR, B. M.; LEVIN, E.; ITANI, R. M.; SARFEH, I. J. *et al.* Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. **Nat Med**. 5(12): 1418-23, 1999.

KIER, L. D.; YAMASAKI, E.; AMES, B. N. Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensates. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 71(10): 4159-63, 1974.

KING, R. S.; TEITEL, C. H.; SHADDOCK, J. G.; CASCIANO, D. A.; KADLUBAR, F. F. Detoxification of carcinogenic aromatic and heterocyclic amines by enzymatic reduction of the N-hydroxy derivative. **Cancer Lett**, 143(2): 167-71, 1999.

KOSTIAINEN, R.; KOTIAHO, T.; KUURANNE, T.; AURIOLA, S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. **J. Mass Spectrom**, 38(4): 357-372, 2003.

KULKARNI, S. K.; JAIN, N. K.; SINGH, A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, 22(5): 291-8, 2000.

LANGENBACH, R., MORHAN, S. G., TIANO, H. F., LOFTIN, C. D., GHANAYEM, B. I., CHULADA, P. C. *et al.* Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid – induced inflammation and indomethacin – induced gastric ulcerations. **Cell**, 83: 483, 1995.

LEVIN, D. E.; HOLLSTEIN, M.; CHRISTMAN, M. F.; SCHWIERS, E. A.; AMES, B. N. A new Salmonella tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 79(23): 7445-9, 1982.

LIM, C. K.; LORD, G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. **Biol Pharm Bull**, 25(5): 547-57, 2002.

LU, A. Y. Drug-metabolism research challenges in the new millennium: individual variability in drug therapy and drug safety. **Drug Metab Dispos**, 26(12): 1217-22, 1998.

LU, F. C.; KACEW, S. **Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs and Risk Assessment**. 3^a ed. Washington DC, 1996. p.27-39

MA, L.; DEL SOLDATO, P.; WALLACE, J. L. Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing: Shifting the angiogenic balance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99(20): 13243-7, 2002.

MAFFI, G.; DALL'ASTA, L.; PEDRAZZOLI, A. Parsalmide: a new anti-inflammatory agent. II. Chemico-physical and analytical characteristics. **Boll Chim Farm**, 115: 135-44, 1976.

MAKI, H. Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. **Annu Rev Genet**, 36: 279-303, 2002.

MALLING, H. V. Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. **Mutat Res**, 13(4): 425-9, 1971.

MALLING, H. V. Incorporation of mammalian metabolism into mutagenicity testing. **Mutat Res**, 566: 183-189, 2004.

MANSUY, D. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, 121(1-3): 5-14, 1998.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutat Res**, 113(3-4): 173-215, 1983.

MASFERRER, J. L.; ZWEIFEL, B. S.; MANNING, P. T.; HAUSER, S. D.; LEAHY, K. M.; SMITH, W. G. *et al.* Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91(8): 3228-32, 1994.

MASON, H. S. OXIDASES. **Annu Rev Biochem**, 34: 595-634, 1965.

MCCANN, J.; AMES, B. N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 73: 950-4, 1976a.

MCCANN, J., AMES, B. N. A simple method for detecting environmental carcinogens as mutagens. **Ann N Y Acad Sci**, 271: 5-13, 1976b.

MCGINNITY, D. F.; RILEY, R. J. Predicting drug pharmacokinetics in humans from in vitro metabolism studies. **Biochem Soc Trans**, 29 (2): 135-9, 2001.

MENCI, S.; ROSSI, M.; DEL CURATOLO, G.; ORSUCCI, P. L. Parsalmide, a new synthetic substance, in inflammatory and arthrosic arthropathies. Double-blind controlled clinical trial. **Minerva Med**, 67: 3361-70, 1976.

MINERS, J. O.; VERONESE, M. E.; BIRKETT, D. D. In vitro approaches for the prediction of human drug metabolism. **Ann rep med chem**, 29: 307-16, 1994.

MIRELLI, E.; FICHERA, G.; BOIDI, G. Endoscopic study on the gastric tolerance of antalgic-antirheumatic substances: parsalmide. **Minerva Med**, 67: 3361-70, 1976.

MIZUNO, H.; SAKAMOTO, C.; MATSUDA, K.; WADA, K.; UCHIDA, T.; NOGUCHI, H. *et al.* Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. **Gastroenterology**. 112(2): 387-97, 1997.

MORTELMANS, K. E.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutat Res**, 455 (1-2): 29-60, 2000.

MORTELMANS, K. E.; STOCKER, B. A. Segregation of the mutator property of plasmid R46 from its ultraviolet-protecting property. **Mol Gen Genet**, 167 (3): 317-27, 1979.

NELSON, D. R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J. J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D. J. *et al.* P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, 6 (1): 1-42, 1996.

OECD (Organization of Economic Cooperation and Development), Guideline for testing of chemicals, guideline 471: Bacterial reverse mutation test, Paris: Organization of Economic Cooperation and Development, 1997.

O'BRIEN, P. J.; HALES, B. F.; JOSEPHY, P. D.; CASTONGUAY, A.; YAMAZOE, Y. GUENGERICH, F. P. Chemical carcinogenesis, mutagenesis, and teratogenesis. **Can J Physiol Pharmacol**, 74(5): 565-71, 1996.

OKUDA, K.; USUI, E.; OHYAMA, Y. Recent progress in enzymology and molecular biology of enzymes involved in vitamin D metabolism. **J Lipid Res**, 36 (8): 1641-52, 1995.

OLIVEIRA, E. J.; WATSON, D. G. Liquid Chromatography-mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics. **Biomed Chromatogr**, 14(6): 351-72, 2000.

ORELLANA, M.; GUAJARDO, V. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. **Rev Med Chil**. 132(1): 85-94, 2004.

PAUL, D.; STANDIFER, K. M.; INTURRISI, C. E.; PASTERNAK, G. W. Pharmacological characterization of morphine-6 beta-glucuronide, a very potent morphine metabolite. **J Pharmacol Exp Ther**, 251(2): 477-83, 1989.

PEARCE, R; GREENWAY, D.; PARKINSON, A. Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. **Arch Biochem Biophys**, 298(1): 211-25, 1992.

PEDRAZZOLI, A.; DALL'ASTA, L.; MAFFI, G.; GIUDICE, A.; FERRERO, E. Parsalmide: a new anti-inflammatory agent. I.Synthesis and preliminary pharmacological activity of a series of 2-alkyloxy-5-amino-N- alkylbenzamides. **Boll Chim Farm**, 115: 125-34, 1976.

PENNACHIN, R. A; LORENZETTI, R.; COUTO, L. E.; PEREIRA, R.; DONATO, J. L.; DE NUCCI, G. Poster In: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental, XXXIV, 2002, Hotel Monte Real, **Anais... Águas de Lindóia**, 2002. p 136.

RAUNIO, H., PASANEN, M., MÄENPÄÄ, J., HAKKOLA, J., PELKONEN, O. Expression of extrahepatic cytochrome P-450 in humans. In: Pacifici, G. M.; Fracchia, G. N. **Advances in Drug Metabolism in Man**. Belgium: European Commission, 1995. p. 235-287.

RIEGER, R.; NICHAEELIS, A.; GREEN, M. M. **Glossary of Genetics: Classical and Molecular**. 5ª ed. Springer – Verlag, New York, 1991.

RIPOLL, J. V. C. Desenvolvimento farmacéutico y metabolismo: los problemas, las necesidades, las herramientas. In ANGOSTO, M. C.; LECHÓN, M. J. G. **Citocromo P-450**. Desenvolvido pela Real Academia Nacional de Farmácia, Espanha, 2004. Disponível em: <<http://www.ranf.com/publi/mono/mono.html>>. Acesso em: 20 jan 2005.

ROBERT, A.; SCHULTZ J. R.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C. Gastric antisecretory and antiulcer properties of PGE₂, 15-methyl PGE₂, and 16, 16-dimethyl PGE₂. Intravenous, oral and intrajejunal administration. **Gastroenterology**. 70(3): 359-70, 1976 .

SANGUINETTI, C. M.; BONIFAZI, F. Report of a controlled clinical trial of a new synthetic drug, parsalmide, in rheumatic arthropathies (inflammatory and degenerative). **Minerva Med**, 67: 3391-5, 1976.

SASAKI, J. C.; FELLERS, R. S.; COLVIN, M. E. Metabolic oxidation of carcinogenic arylamines by p450 monooxygenases: theoretical -support for the one-electron transfer mechanism. **Mutat Res**, 506-507: 79-89, 2002.

SCHMASSMANN, A.; ZOIDL, G.; PESKAR, B. M.; WASER, B.; SCHMASSMANN-SUHIJAR, D.; GEBBERS, J. O. *et al.* Role of the different isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase during gastric ulcer healing in cyclooxygenase-1 and -2 knockout mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 290(4): G747-56, 2006

SCHWARZ, M.; LUND, E. G.; LATHE, R.; BJORKHEM, I.; RUSSELL, D. W. Identification and characterization of a mouse oxysterol 7 α -hydroxylase cDNA. **J Biol Chem**, 272(38): 23995-4001, 1997.

SENLER, T. I.; DEAN, W. L.; MURRAY, L. F.; WITTLIFF, J. L. Quantification of cytochrome P-450-dependent cyclohexane hydroxylase activity in normal and neoplastic reproductive tissues. **Biochem J**, 227(2): 379-87, 1985.

SETCHELL, K. D.; SCHWARZ, M.; O'CONNELL, N. C.; LUND, E. G.; DAVIS, D. L.; LATHE, R. *et al.* Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. **J Clin Invest**, 102(9): 1690-703, 1998.

SHAHIN, M. M.; ANDRILLON, P.; GOETZ, N.; BORE, P.; BUGAUT, A.; KALOPISSIS, G. Studies on the mutagenicity of p-phenylenediamine in *Salmonella typhimurium*. Presence of PCB's in rat-liver microsomal fraction induced by Aroclor. **Mutat Res**, 68(4): 327-36, 1979.

SHANABRUCH, W. G.; WALKER, G. C. Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in recA⁺lexA⁺ dependent mutagenesis. **Mol Gen Genet**, 179(2): 289-97, 1980.

SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; MIMURA, M.; INUI, Y.; GUENGERICH, F. P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. **J Pharmacol Exp Ther**, 270(1): 414-23, 1994.

SIMON, L. S. The COX-2 inhibitors: a reasoned review of the data. **Swiss Med Wkly**, 135(29-30): 419-24, 2005.

SINZ, M. W.; PODOLL, T. The mass spectrometer in drug metabolism In ROSSI, D. T.; SINZ, M. W. **Mass Spectrometry in Drug Discovery**. New York: Marcel Dekker, 2002, 271-336.

SMITH, D. A.; WATERBEEMD, H. VAN DE.; WALKER, D. K.; MANNHOLD, R.; KUBINUI, H.; TIMMERMAN, H. **Pharmacokinetics and Metabolism in design**, Germany, WILEY-VCH. 2001, 160 pages.

SNYDERWINE, E. G.; VENUGOPAL, M.; YU, M. Mammary gland carcinogenesis by food-derived heterocyclic amines and studies on the mechanisms of carcinogenesis of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). **Mutat Res**. 506-507: 145-52, 2002.

SPATZENEGGER, M.; JAEGER, W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. **Drug Metab Rev**, 27(3): 397-417, 1995.

TAFNER, G.; PEDRAZZOLI, M.; BAJOCCHI, E. Controlled clinical trial of parsalimide, a drug with analgesic and anti-inflammatory activity. **Minerva Med**, 67 (52): 3383-90, 1976.

THOMPSON, T. N. Experimental models for evaluating enzyme induction potential of new drug candidates in animals and humans and a strategy for their use. **Adv Pharmacol**, 43: 205-29, 1997.

TRAVIS, T. T. **Carcinogen Risk Assessment: Contemporary Issues in Risk Analysis**. 1^a ed, Springer, New York, p.220, 1988.

VAN HECKEN, A.; SCHWARTZ, J. I.; DEPRE, M.; DE LEPELEIRE, I.; DALLOB, A.; TANAKA, W. *et al.* Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. **J Clin Pharmacol**, 40 (10): 1109-20, 2000.

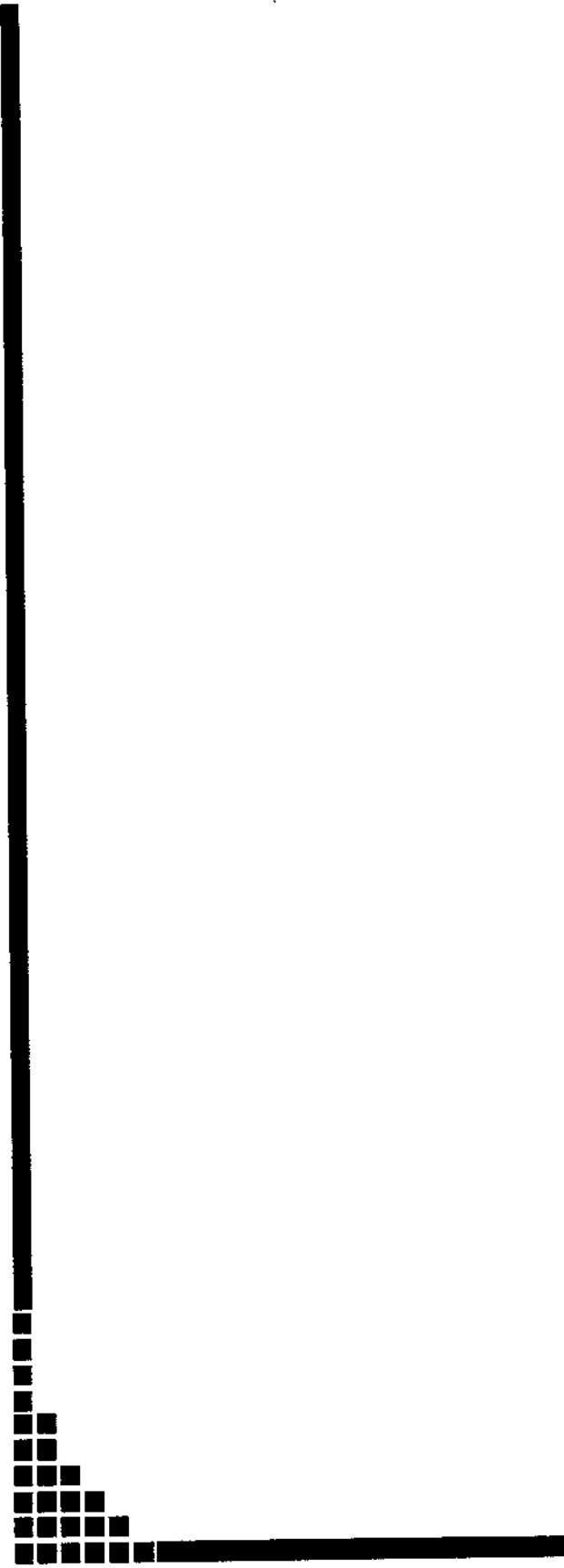
VANDELLI, A.; GULLINI, S.; MAIOLO, P.; SILVANI, G.; COSTA, P. L.; FONTANA, G. Clinical, morphological and functional effects of a non-steroid anti-inflammatory drug on the gastric mucosa. **Minerva Dietol Gastroenterol**, 27: 31-8, 1981.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**. 23; 231(25): 232-5, 1971.

VANE, J. R. The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs. **J Physiol Pharmacol**, 51(4 Pt 1): 573-86, 2000.

VAZ, A. D. N.; PERNECKY, S. J.; RANER, G. M.; COON, M. J. Peroxo-iron and oxenoid-iron species as alternative oxygenating agents in cytochrome P450-catalyzed reactions: switching by threonine-302 to alanine mutagenesis of cytochrome P450 2B4. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93(10): 4644-8, 1996.

- VENKATAKRISHNAN, K.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. **J Clin Pharmacol**, 41(11): 1149-79, 2001.
- VERGERES, G.; WASKELL, L. Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. **Biochimie**, 77(7-8): 604-20, 1995.
- WALKER, G. C.; DOBSON, P. P. Mutagenesis and repair deficiencies of Escherichia coli umuC mutants are suppressed by the plasmid pKM101. **Mol Gen Genet**, 172(1): 17-24, 1979.
- WARNER, T. D.; GIULIANO, F.; VOJNOVIC, I.; BUKASA, A.; MITCHELL, J. A.; VANE, J. R. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96(13): 7563-8, 1999.
- WAXMAN, D. J.; AZAROFF, L. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. **Biochem. J**, 281: 577-592, 1992.
- WERCK-REICHHART, D.; FEYEREISEN, R. Cytochrome P-450: a success story. **Gen Biol**, 1: 1-8, 2001.
- WHELTON, A. Renal and related cardiovascular effects of conventional and COX-2- specific NSAIDs and non-NSAID analgesics. **Am J Ther**, 7: 63-74, 2000.
- WHITTLE, B. J. R. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 17: 301-313, 2006.
- WRIGHT, A. S. The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. **Mutat Res**, 75(2): 215-41, 1980.
- XIE, W. L.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L.; ERIKSON, R. L.; SIMMONS, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1;88(7): 2692-6, 1991.



APÊNDICES

PUBLICAÇÃO EM CONGRESSO

**METABOLIC ACTIVATION OF A NEW ANTI-INFLAMMATORY
BENZAMIDE DERIVATIVE.**

Donato, J.L.; **Cardoso, H.S.**; Bicalho, B.; Genari, P.; De Nucci, G.

Galeno Research Unit – Campinas, SP, Brazil

15th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations: Chemical
Biology in the Postgenomic Era New Approches and Applications.

Mainz, Germany – July, 4th – 9th, 2004

**EVALUATION OF THE MUTAGENIC POTENTIAL OF A NEW ANTI-
INFLAMMATORY DRUG USING AMES TEST.**

Cardoso, H.S.; Donato, J.L.; De Nucci, G.

Department of Pharmacology - UNICAMP, SP, Brazil.

XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

21 a 24 de outubro de 2003 / Águas de Lindóia-SP.

**EVALUATION OF COX INHIBITION BY TWO DICLOFENAC
FORMULATIONS IN HEALTH VOLUNTEERS.**

Pennachin, R.A.O.; **Cardoso, H.S.**; Lorenzetti, R.; Mendes, G.D.;

Muscará, M.N.; Donato, J.L.; De Nucci, G.

Department of Pharmacology - UNICAMP, SP, Brazil.

XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

28 a 31 de outubro de 2002 / Águas de Lindóia-SP.

Processo de avaliação do referido paper: **PUBLICADO**

Eur J Med Chem. 2006 Mar;41(3):408-416. Epub 2006 Jan 18. Related Articles. Links

ELSEVIER
FULL-TEXT ARTICLE

In vitro mutagenicity of anti-inflammatory parsalimide analogues PA7, PA10, and PA31 triggered by biotransformation into hydroxy derivatives.

**Cardoso HS, Bicalho B, Genari P, Santagada V, Caliendo G, Perissutti E,
Donato JL, De Nucci G.**