

UNICAMP

P414e

13590



MARISTELA DE FREITAS PEREIRA

ESTUDOS DA AÇÃO CITO E GENOTOXICA DA VIOLACEINA E DERIVADOS
EM CELULAS DE MAMIFEROS EM CULTURA.

ORIENTADORA: Profa.Dra. N. Marcela Haun Q.

Dissertação apresentada ao Departamento de
Bioquímica do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS.

*Este exemplar corresponde a redação final de tese
defendida pela candidata Maristela de Freitas Pereira
e aprovada pela comissão julgadora*

Maristela F. P.

30/01/91

CAMPINAS , 1991

P414e

13590/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS,

À Profa. Dra. Nora Marcela Haun Quirós, pela orientação deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann, pelo uso do Laboratório de Cultura de Tecidos.

Ao Prof. Dr. Néelson Durán, pelo fornecimento das drogas utilizadas nos experimentos.

A Sra. Maria Alice Bertan Guadagnini, por toda boa vontade e atenção.

As amigas do laboratório Cláudia, Maria Silvia, Ana, Nadja e Denise Ciampi, pela amizade e companheirismo.

À Solange e Mônica Ferreira de Oliveira, por toda atenção, amizade e encorajamento.

À todo pessoal do Departamento de Bioquímica, que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado como também à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela concessão da bolsa de Monitoria II.

Aos meus pais, aos meus irmãos,

e especialmente, ao Marco.

INDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Violaceína : Atividade Antibiótica.....	5
1.2. Violaceína : Potencial Fototerapêutico.....	6
1.3. Violaceína : Ação Tripanocida.....	9
1.4. Nitrocompostos : Quimioterapia de Chagas.....	11
1.5. Nitrocompostos : Mecanismo de Ação.....	15
1.6. Enzimas de Defesa e Compostos Antioxidantes em Sistemas Vivos.....	21
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Reagentes.....	29
3.2. Aparelhos.....	30
3.3. Células : Cultivo e Linhagem	31
3.4. Tratamento com os Agentes	32
3.5. Medidas de Eficiência de Plaqueamento e Sobrevivência Celular.....	33
3.6. Medidas da Taxa de Síntese de DNA.....	34

4. RESULTADOS.....	37
4.1. Sobrevivência de Células V79/M8 Tratadas com Violaceína, Bromo-Violaceína, Metilol-Violaceína, Nifurtimox e Benznidazole.....	37
4.2. Ação de Violaceína e seus Derivados na Replicação do DNA de Células V79/M8.....	41
4.3. Cinética de Recuperação da Síntese de DNA em Células V79/M8 Tratadas com Violaceína e Bromo-Violaceína.....	52
4.4. Estudos de Proteção do Efeito Letal na Viabilidade Celular e na Inibição da Síntese de DNA de Células V79/M8 Expostas à Violaceína na Presença de Catalase.....	55
5. DISCUSSÃO.....	58
5.1. Estudos de Citotoxicidade de Violaceína e Seus Derivados.....	58
5.2. Estudos de Citotoxicidade com Nifurtimox e Benznidazole.....	63
5.3. Estudos da Cinética de Recuperação da Síntese de DNA de Células V79/M8 Tratadas com Violaceína e Bromo- Violaceína.....	65
5.4. Estudos de Proteção da Viabilidade Celular e da Inibição da Síntese de DNA de Células V79/M8 Expostas à Violaceína na Presença de Catalase.....	67

6. CONCLUSÕES.....	70
7. SUMÁRIO.....	72
SUMMARY.....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO .

A partir do final do século XIX, um pigmento de cor roxa, extraído da bactéria *Chromobacterium violaceum*, comumente encontrada em amostras de solo e de meio ambientes tropicais, vem despertando o interesse para o estudo de suas atividades biológicas. Desde então, investigações ocasionais da biossíntese e química deste pigmento vêm sendo realizadas (Riveros e col, 1985 ; Durán, 1989).

O primeiro pesquisador a extrair o pigmento violeta de *Bacillus violaceus* foi Lecoq de Boisbaudran, 1882. O autor não reportou, entretanto, maiores informações a respeito deste composto.

Em 1913, começaram os esforços para determinar a estrutura do composto extraído de *B.violaceus*. Hartley (1913), foi o primeiro a realizar análises espectroscópicas, mas aparentemente não obteve amostras puras do pigmento, devido ao método de extração.

Lasseur e Girardeti (1926), prepararam e purificaram uma pequena quantidade do pigmento, através de culturas de *B.violaceus* em meio contendo asparagina. Os autores, após a

extração, fizeram as análises espectroscópicas, entretanto, os resultados não constam na literatura.

Reilly e Pyne (1927), conseguiram produzir e isolar 60 mg do pigmento a partir de *Chromobacterium violaceum* (B. violaceum), através do cultivo desta em meio contendo lactose, peptona, extrato de carne e água. Os autores sugerem neste trabalho uma fórmula provisória para o pigmento : $C_{50}H_{59}O_{15}N_5$.

A maior limitação nos estudos realizados era a quantidade de produto isolado, portanto, no curso das investigações químicas da Violaceína, tornou-se necessário desenvolver um método para preparação e purificação do pigmento em maiores quantidades. Tobie (1934), relata que a passagem de oxigênio através de culturas mantidas a 27° C em extratos de lactose, produzia um aumento no crescimento da bactéria, observando também, que esta produzia a pigmentação a partir do 6° ao 22° dia de incubação. Estas modificações na metodologia possibilitaram a obtenção de 250 mg de pigmento.

Iniciou-se um aumento gradativo na quantidade produzida (Strong, 1934) de Violaceína e no seu grau de pureza (Sartory e col., 1938) . Na década de 50 Gilman (1953), e Corpe (1953), relataram que a pigmentação produzida pela bactéria era influenciada pela composição do meio de cultura utilizado. Ou seja, os requerimentos nutricionais que até 1940 não foram sistematicamente estudados, começaram a receber a atenção dos

pesquisadores. Os estudos de metabolismo se fizeram necessários e Mitoma e colaboradores (1955), identificando a Violaceína como um derivado 5-hidroxiindol, iniciaram a pesquisa com o metabolismo do triptofano por *C. violaceum*.

A estrutura do composto confirmada por síntese química, foi elucidada por Ballantine e colaboradores (1957). Os resultados mostraram que a molécula de Violaceína consiste de um 5-hidroxi-indol, um alfa pirrolidone e de uma unidade oxiindol. Os autores sugeriram também que estas 3 unidades poderiam ser derivadas do triptofano.

Esta hipótese foi confirmada por De Moss e Evans (1959). Os autores verificaram que este aminoácido era a única substância requerida para a síntese da Violaceína.

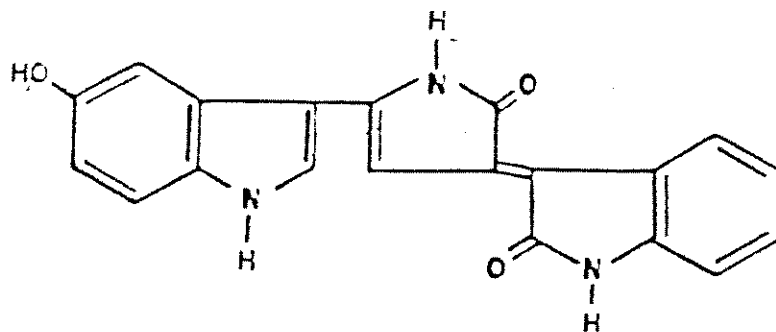


Figura 1: Fórmula estrutural da Violaceína.

Dados posteriores corroboram estes resultados (Sebek e Jager, 1962), pois na biogênese do pigmento de uma cepa não

gelatinosa de *C. violaceum* (ATCC 533), ocorria uma rápida conversão de L-triptofano para Violaceína. Comprovou-se ainda que a bactéria não utilizava este aminoácido para o seu próprio crescimento.

Com base nestas observações foram desenvolvidos ensaios microbiológicos específicos para L-triptofano (Letendre e col., 1974), nos quais, a quantidade de Violaceína produzida é diretamente proporcional à quantidade deste aminoácido presente no ensaio. Os autores sugeriram também que a metabolização de L-triptofano para indol, era feita através de triptofano-sintetases.

Recentemente, a otimização das condições para a biossíntese da Violaceína foi reportada por Riveros e colaboradores (1985). Segundo os autores, a bactéria cultivada a 28° C em pH 7,0, e em um meio de cultura enriquecido com metionina e vitamina B₁₂, produziu rendimentos de aproximadamente 1 % em peso seco da bactéria.

Riveros e colaboradores (1987), demonstraram que a síntese do pigmento era acentuada após 15 horas de incubação, quando utilizaram tioglicolato como meio de cultura a 30° C. Os autores observaram que a velocidade de síntese do pigmento era diretamente proporcional à concentração de células.

Embora a Violaceína fosse conhecida há vários anos na literatura, não existia nenhum dado de caracterização espectroscópica. Riveros e colaboradores (1987), mostraram a caracterização completa da molécula por Ultra - violeta (U.V.), Infra - vermelho (I.V.), Espectroscopia de massa (E.M.), e Ressonância nuclear magnética (RMN¹H).

1.1. VIOLACEÍNA : ATIVIDADE ANTIBIÓTICA.

Os efeitos tóxicos de Violaceína foram primeiramente descritos por Kidder e Stuart (1939), e por Burbank (1942). Os autores verificaram que alguns ciliados (*Colepoda cucullus*) eram rapidamente exterminados quando agitados com amostras de *C.violaceum*. Embora o efeito letal tenha sido correlacionado com o pigmento sintetizado pela bactéria, uma hipótese foi sugerida na época : a *C.violaceum* formava cianeto como um metabólito normal, o qual era responsável pelo efeito letal. Entretanto, esta hipótese não é mais aceita (Durán e Faljoni-Alario, 1980 a e b).

Em 1945, foi sugerido por Lichstein e Van De Sand que o pigmento isolado da bactéria poderia ter propriedades antibióticas, e que exerceria ação bactericida contra

Staphylococcus aureus.

Dados de literatura nos mostram que *Chromobacterium violaceum* é capaz de metabolizar alguns compostos como por exemplo, N-carbenzoxil-L-triptofano em um derivado 2-3-dihidro, e ácido indol-3-propiónico em indol-3-acrílico (Nakazawa e col., 1972). Estes produtos de biotransformação têm sido encontrados como componentes estruturais em vários antibióticos peptídicos (Letendre e col., 1974).

Atualmente pesquisadores sugerem que além das propriedades antibióticas (De Moss, 1967), a Violaceína possui potencial fototerapêutico (Campos e col., 1982 ; Durán e Faljoni-Alario, 1980 a e b).

1.2. VIOLACEÍNA : POTENCIAL FOTOTERAPÊUTICO.

No Brasil, a *Chromobacterium violaceum* (cepa BB 78) foi encontrada nas margens do Rio Negro, na Amazônia (Caldas, 1977).

A síntese de Violaceína e os produtos da sua fotólise causada pela luz solar, poderiam explicar a baixa fertilidade das águas do Rio Negro, em contraste com os outros afluentes do Rio Amazonas (Caldas, 1977). Este fato provavelmente estaria relacionado às propriedades antibióticas e fotobiológicas de

Violaceína (Caldas e col, 1978 ; Muel e Santos, 1978 ; Durán e Faljoni-Alario, 1980 b).

Campos e colaboradores (1982), avaliaram o potencial fototerapêutico do pigmento, comparando suas propriedades espectrais e fotodinâmicas com compostos fototerápicos conhecidos como eosina, cristal-violeta, hematoporfirina e azul de metileno, sugerindo que a Violaceína poderia ter um uso potencial como droga fotoquimioterápica .

Quando Violaceína era fotolisada, o maior produto obtido, foi inicialmente caracterizado como 4-[1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-4-hidroxi-2(1,3-dihidro-2H-indol-2)]but-3-enóico lactona, denominado pigmento II. A atividade anti microorganismos Gram positivos e Gram negativos, da Violaceína e do pigmento II, já foi reportada (Durán e col., 1983), sendo a Violaceína o composto com maior atividade.

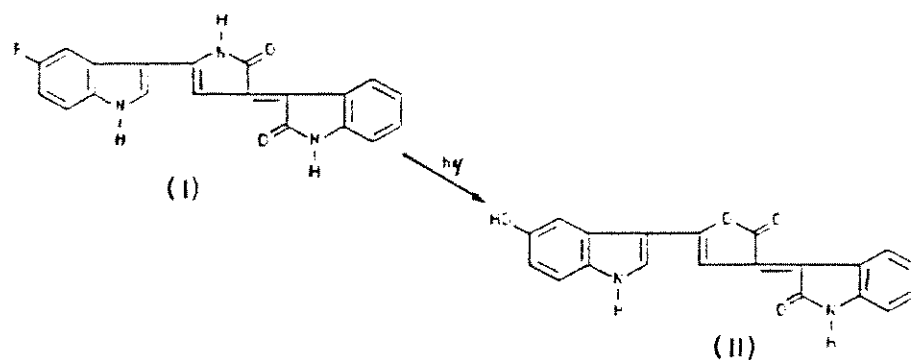


Figura 2: Fotólise da Violaceína (I).

O pigmento II é mais solúvel em água que a Violaceína (Durán e Faljoni-Alario, 1978 ; Durán e col., 1983), o que levanta a possibilidade de um estudo e aplicação interessante na ação antibiótica *in vivo*. Na procura de derivados com maior solubilidade aquosa, foram sintetizados vários compostos (sal sódica, Violaceína acetilada e etc), e relatados numa patente (Durán, 1989) sendo representados na Fig 3 apenas os que foram testados na sua ação citotóxica em nossos estudos.

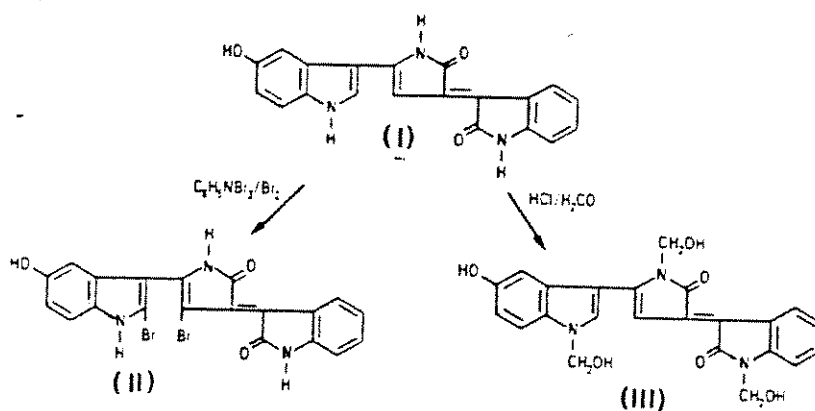


Figura 3: Fórmulas estruturais dos pigmentos :
Violaceína (I); Bromo-Violaceína (II) e Metilol-
Violaceína (III).

1.3 VIOLACEÍNA : AÇÃO TRIPANOCIDA.

A Doença de Chagas é uma infecção parasitária que afeta milhões de latino-americanos (Dias, 1984). Estima-se que a incidência da infecção no Brasil seja de 120.000 novos casos/ano, e que além disso, nas áreas endêmicas do país uma entre 10 mortes nos indivíduos de 25 a 64 anos seja devido à Doença de Chagas (Moncaya, 1986).

A exposição do *Trypanosoma cruzi* (em formas epimastigotas, cepa Y) a extratos de Violaceína, na concentração de 75 ug/ml, causou a morte de 100% dos parasitas em cultura em fase exponencial de crescimento (Caldas e col., 1978 ; Durán e col., 1987)

Em nossos laboratórios reportamos o efeito da Violaceína e derivados sobre a motilidade de *T. cruzi* (epimastigotas, cepa Tulahuen) in vitro, comprovando assim sua ação tripanocida

Tabela 1: PERCENTAGEM DE MOTILIDADE DE TRIPANOSOMA CRUZI
(EPIMASTIGOTA) APÓS INIBIÇÃO COM VIOLACEÍNA E DERIVADOS (a)

DOSE (ug/ml)	Controle	Violaceína	Metilol	Bromo
0	95%	-	-	-
10	-	86%	86%	86%
20	-	86%	0	80%
40	-	80%	0	50%

(a) 48 horas de incubação.

Tabela 2: INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE TRIPANOSOMA CRUZI COM
VIOLACEÍNA E DERIVADOS .

Dose(ug/ml)	Violaceína	Metilol	Bromo
10	23%	23%	23%
20	38%	100%	40%
40	45%	100%	100%

Observa-se que o derivado Metilol é o mais eficiente na imobilização do *T. cruzi* , podendo assim ser o derivado mais eficaz para o tratamento da Doença de Chagas.

1.4. NITROCOMPOSTOS : QUIMIOTERAPIA DE CHAGAS.

A quimioterapia da Doença de Chagas na América do Sul é baseada principalmente no uso de dois medicamentos, Nifurtimox (Bay 2502 : Lampit) e Benznidazole (Ro 7-1051 ; Radanil; Rochagan) (Docampo e Moreno, 1984 , 1986 ; Silva e col., 1986 ; De Castro e col., 1986). O primeiro composto, Nifurtimox (4-((5-nitrofurfuriliden)amino)-3 metiltiomorfolina-1,1-dióxido), é um derivado nitrofurano, e o Benznidazole (2 Nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazole-1-acetamida), pertence a família dos nitroimidazoles.

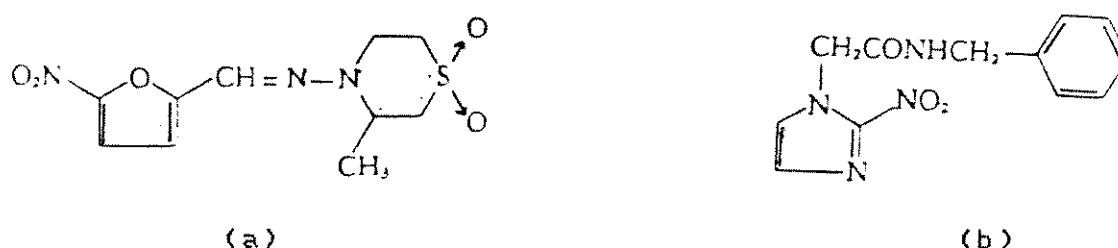


Figura 4: Fórmulas estruturais dos Nitrocompostos: Nifurtimox (a) e Benznidazole (b).

Até 1981, pouco era conhecido a respeito destes dois compostos (Voogd, 1981). Entretanto, estudos posteriores avaliaram e indicaram que Nifurtimox é mutagênico para *Salmonella typhimurium* (Nagel e Nepomnaschy, 1983), e apresenta genotoxicidade para *Drosophila melanogaster*, *Allium*

cepa e um aumento significativo, no número de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de ratos (Spano e Takahashi, 1981).

Com a ajuda de testes com células em cultura, e testes "in vivo" com ratos, foi verificado que Nifurtimox, é efetivo para a forma amastigota intracelular e tripomastigota extracelular do parasita no hospedeiro vertebrado (Haberkorn e Gonnert, 1972).

Dados da literatura nos mostram que uma concentração de 10 μ M de Nifurtimox bloqueia o ciclo intracelular de *L. cruzi* (cepa Ernestina), e que na faixa de 10 a 100 μ M inibe a penetração dos tripomastigotas nas células do hospedeiro vertebrado (Dvorak e Howe, 1977).

Embora Nifurtimox seja efetivo contra o parasita "in vitro", quando usado clinicamente a droga exerce ação supressiva e não curativa (Wegner e Rohnedder, 1972). Através de xenodiagnóstico sensível e métodos imunológicos para detectar *L. cruzi* em pacientes tratados com a droga, verificou-se que esta reduzia a parasitemia a níveis muito baixos, mas não eliminava o protozoário completamente (Cançado e col., 1976).

Benznidazole, a outra droga utilizada clinicamente, é mutagênica para *Klebsiella pneumonia* (Voogd e col., 1975) e para *Salmonella thierhimerium* (Nagel e Nepomnaschy, 1983).

Os ensaios de carcinogenicidade em camundongos tratados com Benznidazole, 8 mg/Kg/dia durante 60 dias, indicaram uma elevada incidência de linfomas malignos (Teixeira e col., 1985)

Apesar de Gorla e Castro (1985), não terem observado um aumento nos danos citogenéticos em ratos, estes autores afirmam em trabalhos posteriores (Gorla e col., 1988 e 1989), que Benznidazole não é inócuo para o material genético, ao verificar que crianças chagásicas (2 meses a 12 anos de idade) tratadas com 5 mg/Kg/dia durante 30 dias, apresentavam um aumento no número de aberrações cromossômicas após o tratamento. Este fato corrobora as observações feitas em 1986 por Gorla e colaboradores quando, nos estudos *in vitro* os autores sugerem a interação de metabólitos reativos de Benznidazole com DNA e proteínas nucleares. Apesar de nos estudos *in vivo* com ratos (Gorla e Castro, 1985) não ter sido detectado a presença de micronúcleos em células de medula óssea, nem troca de cromátides irmãs em linfócitos (Gorla, 1987).

Efeitos colaterais agudos produzidos por Benznidazole como dermatotoxicidade, neurotoxicidade, e desordens digestivas, são bem conhecidos em pacientes chagásicos (Boiannain, 1979 ; Carpintero, 1983 ; Laplumé e col., 1985).

Apesar da atividade genotóxica comprovada destes nitrocompostos e nitroimidazoles "*in vivo*" e "*in vitro*" (Ebringer e Bencova, 1980 ; Spano e Takahashi, 1981 ; McCalla,

1983 ; Ferreira e Ferreira, 1986.a e b ; Nagel,1987), estes compostos têm uso clínico ativo no tratamento da Doença de Chagas (Gorla e col., 1988 e 1989)..

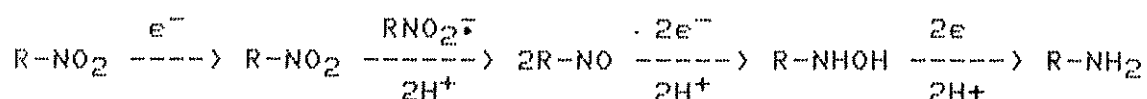
1.5.NITROCOMPOSTOS : MECANISMO DE AÇÃO.

Os efeitos tóxicos de Nifurtimox e Benznidazole se devem à sua biotransformação nitrorredutiva para radicais reativos, ou outros metabólitos que possam reagir com constituintes celulares, causando efeitos deletérios (Gorla e col., 1986).

A ativação biológica de compostos nitroheterocíclicos, a qual é dependente de alguns fatores tais como, níveis de enzimas antioxidantes, níveis de agentes amplificadores como o oxigênio, disponibilidade de enzimas que possam iniciar o processo redutivo, leva a uma situação de toxicidade no organismo (Docampo e Stoppani, 1979). Quando isto ocorre, dois mecanismos podem ser considerados : 1) a formação de agentes alquilantes e 2) o ciclo redox dependente de oxigênio (McLane e col., 1983).

A ação tripanocida de Nifurtimox é devida ao ciclo redox (Docampo e Stoppani, 1979).

O primeiro passo na redução de compostos nitroheterocíclicos, é a formação do radical nitro ânion ($R-NO_2^{\cdot-}$) (Moreno e Docampo, 1985). Este intermediário é o primeiro produto da redução, o qual deve ser responsável pela toxicidade.



Em condições aeróbicas, este radical (R-NO_2^-) é rapidamente oxidado pelo oxigênio molecular, regenerando o grupo nitro e produzindo ânion superóxido.



A regulação do nível de toxicidade é muito variada entre os diferentes sistemas estudados. É conhecido que um ou mais produtos de redução como o derivado nitroso e hidroxialamina, como também superóxidos e peróxido de hidrogênio devam participar no mecanismo de toxicidade em vários tipos de células (Docampo e Moreno, 1985). Considerando, a presença de nitrorredutases; a ação de mecanismos bioquímicos e de enzimas de defesa; a capacidade de reparar danos produzidos por nitrocompostos, bem como o habitat aeróbico ou anaeróbico dos parasitas.

Desde 1970, progressos significativos têm se alcançado na área do conhecimento da ação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em parasitas (Docampo e Stoppani, 1979).

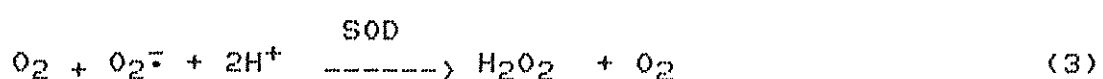
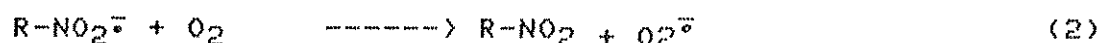
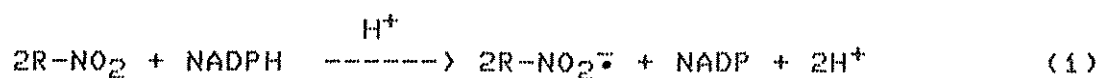
Sabe-se que muitas enzimas oxidativas quando reagem com os nitro derivados, são capazes de produzir amostras de O_2^- e ou H_2O_2 em tecidos de mamíferos. Algumas destas enzimas têm sido

H_2O_2 em tecidos de mamíferos. Algumas destas enzimas têm sido identificadas em muitos parasitas como por exemplo, a NADPH citocromo c redutase de *L. cruzi*, e a succinato oxidase de *Ascaris lumbricoides*. Entretanto, uma completa identificação das mesmas e dos substratos que formam $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 em parasitas ainda não foi concluída (Docampo e Moreno, 1984).

As flavoproteínas possuem um papel importante no metabolismo redutivo devido à versatilidade química da coenzima, que é capaz de mediar a transferência de elétrons para uma grande variedade de grupos funcionais (Boveris e Stoppani, 1977). Os nucleotídeos de piridina reduzidos encontrados em altas concentrações nas células, constituem as principais fontes de elétrons para a via redutiva (Docampo e col., 1981 a).

A adição de Nifurtimox a homogenados de *L. cruzi* (formas epimastigotas, tripomastigotas ou amastigotas) contendo NADPH, fornece um espectro de ESR correspondente à formação do radical nitro ânion. O sinal do radical nitro ânion é observado após um período de indução, o qual depende da concentração de oxigênio e de nucleotídeos de piridina no meio de incubação (Docampo e col., 1981 a e b). O radical nitro ânion, o qual é o primeiro produto da atividade de nitroredutases, reage com o oxigênio em condições aeróbicas, aumentando a liberação de H_2O_2 das células para o meio de suspensão (Docampo e Stoppani, 1979), aumentando assim, a produção de $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 , e inibindo completamente o crescimento do parasita (Docampo e Stoppani, 1980). As reações que ocorrem

são as seguintes : (Esquema I)



A reação (1), envolve a participação da enzima nitroredutase, e acontece nas membranas mitocondriais e do retículo endoplasmático. A reação (2), já foi descrita em sistemas químicos (Wardman e Clarke, 1976). A reação (3), é de dismutação para peróxido de hidrogênio. A reação (4), leva à uma produção de radical hidroxila, uma das espécies mais reativas resultantes da redução univalente do oxigênio (Fridovich, 1976). As reações (3) e (4), levam a formação de espécies que podem agir sobre o DNA (Olive, 1979) e produzir peroxidação de lipídeos, acarretando desde inativação de membranas, até morte celular (Docampo e col., 1978).

Entretanto, nenhuma formação do radical nitro ânion foi observada após a incubação de preparações microsossomais de *I. cruzi* suplementadas com NADPH e Benznidazole (Docampo e Moreno, 1984). Há estudos com Benznidazole onde foi inibido o crescimento de formas epimastigotas de *I. cruzi* utilizando altas concentrações que estimularam a geração de $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 ; indicando assim, que o efeito tripanocida in vivo não é dependente da formação de ERO (Moreno e col., 1982).

Para o derivado nitroimidazólico, Benznidazole, ocorre também a redução para o radical nitro ânion in vivo, induzindo a geração de $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 (Van den Bossche, 1978). Este fato foi observado através do uso desta droga em conjunto com microsossomos de fígado de rato (Moreno e col., 1982), em homogenados de formas epimastigotas de *I. cruzi* contendo NADH, demonstrando assim a necessidade de ativação metabólica (Docampo e Moreno, 1984).

Assim sendo, devemos considerar que o ciclo redox para Benznidazole seja uma via de desintoxicação (Docampo e Moreno, 1984), e este fato é baseado no potencial de redução desta droga (Moreno e col., 1982). O baixo potencial de redução de Benznidazole ($E_o = -0,38$ mV), dificulta a produção de ERO à níveis muito altos, ao contrário de Nifurtimox ($E_o = -0,250$ mV) (Moreno e col., 1982 ; Masana e col., 1984).

Em células de mamíferos a redução do grupo nitro é mediada por NADH e flavoproteínas, incluindo xantina oxidase,

NADPH citocromo P₄₅₀ redutase e NADPH citocromo redutase (Brown, 1982).

Nas reações que ocorrem durante a redução enzimática, há formação de um derivado radicalar que reage com o oxigênio, gerando ânion superóxido, o qual se dismuta para H₂O₂. (Esquema I).

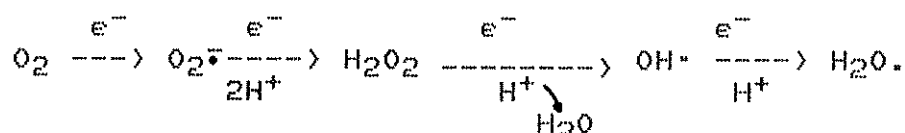
Foi estudado o dano produzido a nível de DNA por um derivado nitroimidazólico (Misonidazole) reduzido eletroliticamente, comprovando-se que o efeito é dependente da composição de bases do DNA, preferencialmente das bases adenina e timina (Rowley e col., 1980).

Pesquisas posteriores corroboram estes fatos, revelando que nitroimidazoles clivam ligações fosfodiésteres ao redor dos resíduos de timina no DNA (Knox e col., 1981). É também conhecido que Nitroimidazoles redutivamente ativados também se ligam ao RNA e a outras proteínas celulares (Stratford, 1986).

1.6.ENZIMAS DE DEFESA E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS VIVOS.

O fenômeno da toxicidade do oxigênio em parasitas foi primeiramente estudado por Cleveland (1925), quando observou que após exposição do térmita *Iermopsis nevadensis* a 1 atm de oxigênio durante 24 horas, o flagelado *Trichomonas termopsis* desaparecia completamente do intestino do hospedeiro.

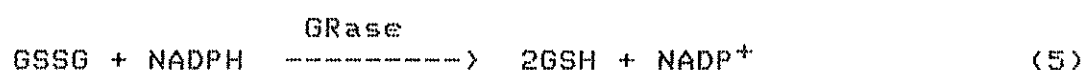
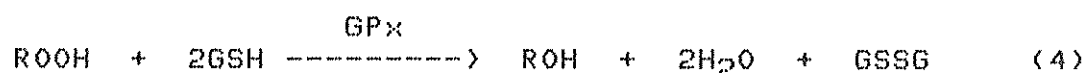
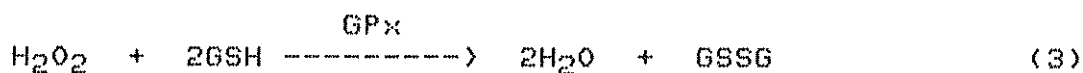
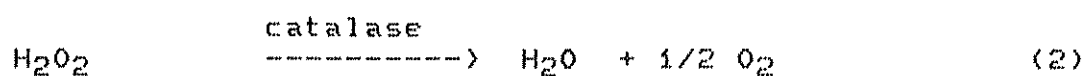
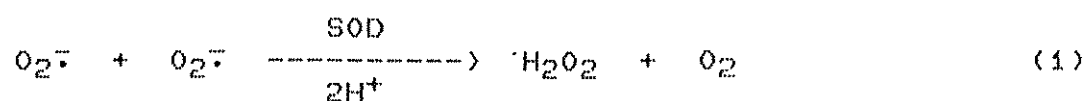
O oxigênio é tóxico não devido a sua própria reatividade, mas sim, aos intermediários gerados até sua redução para água. Esta é feita através de uma série de transferências simples de elétrons, as quais geram espécies reativas de oxigênio (ERO). Estas espécies reativas isto é , radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), são as causas da toxicidade do oxigênio (Fridovich, 1976). Portanto, organismos que utilizam oxigênio, devem ter mecanismos que minimizem a produção destas ERO em primeira instância, e também mecanismos que possam sequestrar eficientemente os produtos que não possam ser detoxificados.



Os principais mecanismos de defesa contra as ERO em tecidos de mamíferos são exercidos pela ação de enzimas, entre elas, a superóxido dismutase (SOD), catalase , glutational

peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GRase). Outras biomoléculas com propriedades antioxidantes, e que ajudam na defesa do organismo são o alfa tocoferol (Vitamina E), a glutathione, o ácido ascórbico (Vitamina C) (Fridovich, 1983), as quais agem como sequestradoras de espécies reativas (Reich e Stivala, 1969).

As enzimas mencionadas acima, catalizam reações específicas como demonstrado nos esquemas a seguir : (Esquema II)



A reação (1) é de dismutação. A reação (2) é catalisada pela catalase, responsável pela eliminação de hidroperóxidos. As reações (3) e (4), são catalizadas pela glutathione peroxidase, a qual usa peróxidos como substrato como, o peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos, reduzindo-os às expensas do redutor endógeno GSH (glutathione reduzida). A reação (5) catalizada pela glutathione redutase mantém o pool de glutathione reduzida intracelular.

Certos protozoários como por exemplo, o *I. cruzi*, parecem não possuir enzimas de defesa, como a catalase e glutathione peroxidase (Docampo e Moreno, 1984), nas diferentes formas do parasita (Boveris e Stoppani, 1977). Tal fato despertou o interesse para o uso de agentes anti-parasitários que atuem através da formação de espécies reativas de oxigênio, as quais seriam então, altamente tóxicas para o parasita (Docampo e Moreno, 1984).

Como já citado anteriormente, homogenados contendo formas epimastigotas de *L. cruzi*, se mostraram sensíveis à adição de drogas nitroheterocíclicas como Nifurtimox e Benznidazole, as quais aumentaram a geração intracelular de H_2O_2 (Docampo e Stoppani, 1979). Assim sendo, o *L. cruzi* é considerado deficiente em mecanismos enzimáticos na redução de peróxidos (Docampo e Moreno, 1984 ; Boveris e col., 1980). De fato, a atividade de superóxido dismutase em *L. cruzi* é relativamente baixa quando comparada à atividade desta enzima em tecidos de mamíferos (Boveris e Stoppani, 1977 ; Boveris e col., 1980).

O principal mecanismo de defesa das formas tripomastigotas de *L. cruzi*, baseia-se na ação de uma enzima denominada tripanotiona redutase. (Try Rase) (Henderson e col., 1988).

Fairlamb e Cerami (1985), demonstraram que a redução NADPH dependente da glutathiona oxidada, por extratos de células de uma grande variedade de tripanossomatídeos, requeria a presença de um composto de baixo peso molecular, contendo pontes de dissulfetos. Este composto foi posteriormente isolado por Fairlamb, (1985), e identificado como análogo da glutathiona oxidada. Este composto foi denominado como tripanotiona (N - N -bis(L-Y-glutamyl-L-hemicistinilglicil)espermidina).

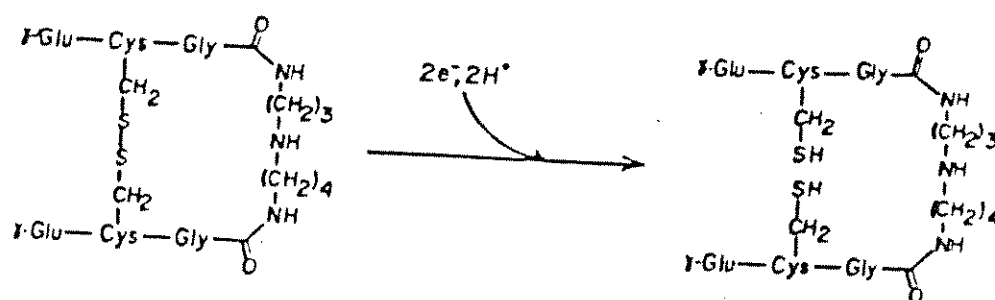


Figura 5: Conversão de Tripanotiona Oxidada para Tripanotiona Reduzida.

A purificação e a caracterização da enzima tripanotiona redutase foi feita recentemente por Shames e colaboradores (1986), a partir de *Chrcitidia fasciculata* e de *Icripanosoma congolense*. Constataram que esta possui propriedades físicas e químicas semelhantes à glutathione redutase de eritrócitos humanos.

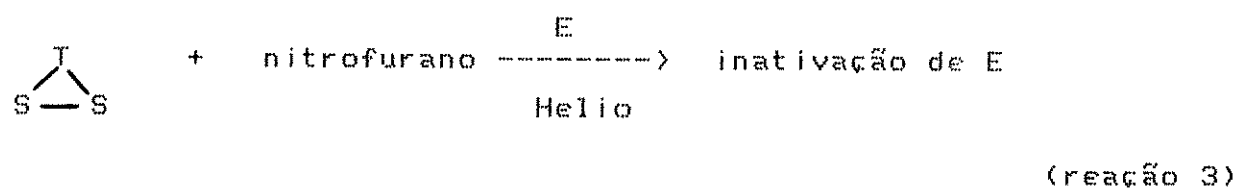
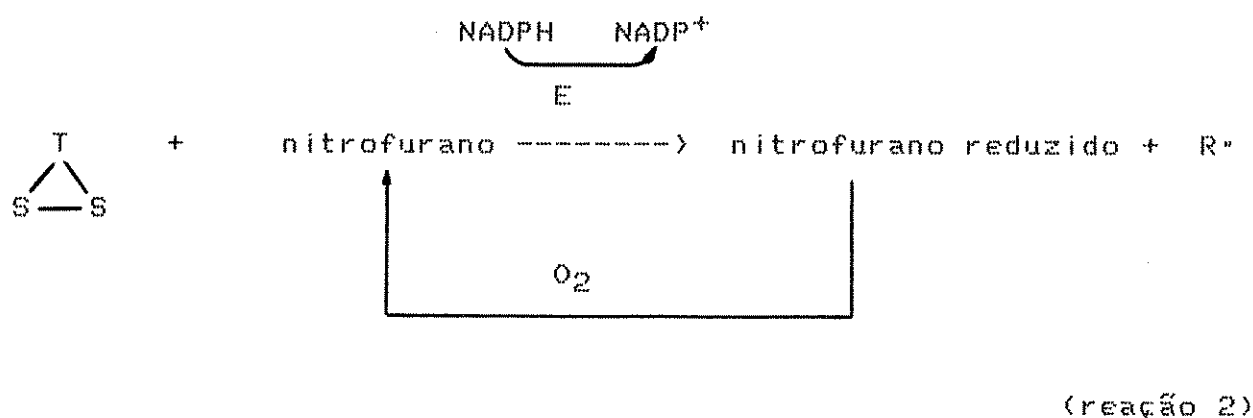
Tripanotiona redutase é uma nova enzima da família das flavoproteínas que contém pontes de dissulfeto, a qual inclui, glutathione redutase, lipoamida desidrogenase e mercúrio redutase (Shmames e col., 1986).

A tripanotiona redutase atua como um sistema antioxidante que parece ser específico para tripanossomatídeos (Shames e col., 1986), catalizando a reação (1) (NAD(P)H dependente). A tripanotiona reduzida é capaz de sofrer uma reação

rápida de troca não enzimática de dissulfetos com outros dissulfetos intracelulares, entre estes, glutathiona oxidada e cisteína, reação (2). Estas reações estão sumarizadas como :



Esta enzima pode também usar como substrato outros compostos como por exemplo, os nitrofuranos e naftoquinonas. As reações de nitrofuranos com a tripanotiona redutase são de especial interesse, e estudadas em condições aeróbicas (reação 2) e anaeróbicas (reação 3), ambas na presença do substrato fisiológico da enzima :



A comprovação que substratos como os nitrofuranos podem ser catalizados aeróbicamente pela enzima Try Rase, provocando a formação de radicais, consumo de NADPH, e inibindo a redução específica de tripanotona (TS_2), abre expectativas no campo para a procura de novas drogas com ação tripanocida, que atuem por mecanismos diferentes à formação de ERO ou espécies reativas de nitro derivados (Henderson e col., 1988). Está comprovado que existe uma correlação entre atividade tripanocida de nitrofuranos com a afinidade da enzima Try Rase por seu substrato (Henderson e col., 1988).

2. OBJETIVOS.

Muitas drogas têm sido utilizadas na quimioterapia da "Doença de Chagas". Entretanto, apesar de serem efetivas contra esta parasitemia, esses compostos apresentam um elevado grau de toxicidade para o organismo hospedeiro.

Como objetivo principal deste trabalho, nos propusemos a avaliar e comparar os efeitos citotóxicos de um possível composto antichagásico, o pigmento de cor roxa extraído da bactéria *Cromobacterium violaceum*, a Violaceína e seus derivados sintéticos, com os dois antichagásicos comerciais, Nifurtimox e Benznidazole. A finalidade era encontrar o derivado menos tóxico para células de mamíferos, que fosse solúvel em sistemas aquosos e que no entanto, mantivesse as características tripanocidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. REAGENTES.

A procedência dos reagentes foi a seguinte:

O meio de cultura das células, meio Eagle modificado por Dulbecco - Flow. Lab., McLean, EUA.

O soro fetal bovino - Cultilab, Campinas, S.P.

Os antibióticos, penicilina e sulfato de streptomicina - Laborclin, Pinhais, Brasil.

Os isótopos - Amersham International (79 Ci/mmol-Timidina-³H e - Du Pont (78,3 Ci/mmol-Timidina-³H).

A tripsina - Difco, Detroit, EUA.

A Violaceína, seus derivados sintéticos, bem como Nifurtimox e Benznidazole, foram fornecidos pelo Dr. Nelson Durán do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNICAMP.

Os sais usados na preparação dos tampões provinham de várias firmas :

O bicarbonato de sódio - Reagen (P.A.), São Paulo, Brasil.

O cloreto de sódio - Reagen (P.A.), São Paulo, Brasil.

O cloreto de potássio - da Riedel-De Haen AG, Alemanha.

O cloreto de cálcio dihidratado - Merck (P.A.), Brasil.

O etileno diaminotetraacetato de sódio (EDTA) - Reagen, São Paulo, Brasil.

O fosfato monobásico de sódio - Carlo Erba (P.A.), Milão, Itália.

O fosfato dibásico de sódio - Sigma, St. Louis, EUA. (P.A),

O tolueno e o etanol - Merck, Brasil.

O formol - Conelgo (P.A).

O cristal-violeta - Carlo Erba, Milão, Itália.

O PPO eo POPOP - New England Nuclear,

O TCA - Reagen (P.A), São Paulo, Brasil.

O hidróxido de sódio - Merck, Brasil.

O dimetil sulfóxido - Aldrich, Milwaukee, EUA.

A catalase - Sigma (20.000 u/mg),

3.2. APARELHOS.

As leituras de absorbância foram efetuadas em espectrofotômetro UV-visível da Beckman, modelo D.B, e as de radioatividade em espectrofotômetro de cintilação líquida da Beckman, modelo LS 100C.. A contagem das células era feita em câmara de Neubauer, com a ajuda de um microscópio invertido da Nikon, Japão. As colônias de células foram contadas com auxílio de um estereomicroscópio da Zeiss, Alemanha.

Os trabalhos estéreis de subcultivos e tratamento das células foram realizados em um fluxo laminar da Vêco, Campinas, Brasil.

As células foram mantidas em incubadora com câmara d água dupla da Tec Termo, São Paulo, Brasil.

3.3. CÉLULAS: CULTIVO E LINHAGEM.

Os experimentos foram realizados utilizando-se um clone derivado da linhagem V79 de Hamster Chinês (V79/clone M8), cedido pelo Prof. Dr. Rogério Meneghini da Universidade de São Paulo. As células V79 são fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês, transformados pelo vírus de câncer animal SV40 (Simian Virus 40) (Ford e Yerganian, 1958).

As células foram rotineiramente cultivadas para estoque em garrafas de vidro (garrafas para diluição de leite), em meio de cultura completo, ou seja, meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 100 U/ml de penicilina e 100 ug/ml de sulfato de estreptomicina, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB).

As células cresciam aderidas ao fundo da garrafa, até atingir a densidade de confluência, formando uma monocamada, sendo mantidas à 37° C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

Os subcultivos foram feitos mediante repiques periódicos das células, lavando-se as mesmas com PBS (NaCl 37mM ; KCl 2,7mM Na₂PO₄ 8mM e KH₂PO₄) e tripsinizando-se com solução de tripsina 0,1 % em PBS contendo 0,01 % de EDTA. Aliquotas dessa suspensão foram então transferidas para novas garrafas de cultura.

3.4. TRATAMENTOS COM OS AGENTES.

Tanto Violaceína como Br-Violaceína, Nifurtimox e Benznidazole foram dissolvidos em DMSO (dimetil-sulfóxido 99,9% grau espectroscópico), e, imediatamente após a solubilização, diluídas adequadamente PBS contendo Ca²⁺ (1mM) previamente a sua utilização nos tratamentos.

O Metilol-Violaceína foi dissolvido em água destilada filtrada (Filtro Millipore GSW 02500) e imediatamente após total solubilização, diluído em PBS-Ca²⁺ antes de sua utilização nos tratamentos.

Todas as incubações foram feitas à 37° C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂.

3.5. MEDIDAS DE EFICIENCIA DE PLAQUEAMENTO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR.

Como parâmetro de sobrevivência celular, mediu-se a capacidade de células individualizadas se reproduzirem e formarem colônias de pelo menos 50 células. Para isso células de uma cultura em crescimento exponencial foram tripsinizadas, individualizadas por pipetagens sucessivas, contadas em câmara de Neubauer e então diluídas à uma densidade de 150 células/ml. A cada placa de Petri de 5 cm de diâmetro eram então adicionados 2 ml dessa suspensão celular em DMEM suplementado com 20 % de SFB, 300 células V79/M8/placa. Após um período de incubação de 6 horas à 37° C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂ para fixação das células, procedeu-se ao tratamento com os agentes em concentrações crescentes especificadas nas legendas das figuras.

O tratamento com os agentes era feito por 30 minutos a 37° C.

Após a retirada dos agentes, as células foram lavadas com PBS-Ca²⁺, e então foram cultivadas em meio de cultura (DMEM) suplementado com 20 % de SBF, durante 7 dias, para o crescimento

clonal.

As colônias foram então lavadas com PBS- Ca^{2+} , fixadas com formol (10 %) e coradas com violeta cristal (1 %). As colônias com mais de 50 células foram contadas com o auxílio de um estereomicroscópio.

A razão entre o número de colônias formadas e o número de células semeadas fornecia a eficiência de plaqueamento que, nas condições controle era geralmente de 80 % a 100 %.

A sobrevivência foi expressa em termos da porcentagem de colônias sobreviventes ao tratamento, em relação aos controles.

3.6. MEDIDAS DE TAXA DE SINTESE DE DNA.

Células de uma cultura em crescimento exponencial foram processadas com descrito no item 3. Após contagem das células, estas foram semeadas numa densidade de 5×10^4 células V79/M8/placa de 2,5 cm de diâmetro (Descarplast) e incubadas por 66 horas à 37° C em atmosfera úmida com 5 % de CO_2 em meio de cultura (DMEM), suplementado com 10 % de SBF. Após esse período foi feito o tratamento com os agentes por 30 minutos, nas

concentrações especificadas nas legendas das figuras, após o qual, as células foram lavadas com PBS- Ca^{2+} .

A seguir, procedia-se à marcação das células com timidina- ^3H , incubando-se as mesmas em meio de cultura (DMEM) contendo o isótopo (5 - 10 $\mu\text{Ci/ml}$; 50 CiM) por 30 minutos.

Completado o tempo da marcação, as células foram lavadas sucessivamente com PBS- Ca^{2+} , fixadas com TCA a 5 % gelado e lavadas duas vezes com etanol 95 % gelado.

Após a secagem das placas à temperatura ambiente, procedia-se à lise das células, adicionando-se 1 ml de NaOH 0,5M/placa, seguido de incubação à 37°C por 60 minutos.

A quantidade de timidina- ^3H incorporada no DNA foi determinada como a radioatividade do material celular ácido insolúvel. Para isso, alíquotas de 100 μl do lisado celular foram aplicadas sobre tiras de papel Whatman nº 17 de 1,8 x 1,9 cm, em duplicatas, as quais foram precipitadas com TCA a 5% gelado, lavadas duas vezes com etanol 95 % gelado, e finalmente, lavadas uma vez com acetona gelada. As tiras de papel eram postas na estufa para secarem (30°C), e a radioatividade determinada em frascos de cintilação contendo 5 ml de PPO : POPOP : tolueno (4,0g : 0,1g : 1L) em espectrofotômetro de cintilação líquida da Beckman LS-100C. O restante do lisado foi utilizado para leitura de absorbância a 260 nm no espectrofotômetro da Beckman D.B. a fim de quantificar o conteúdo de ácidos nucleicos. A razão entre

a radioatividade incorporada e de absorbância a 260 nm, foi tomada como expressão da taxa de síntese de DNA (cpm/A₂₆₀). Os valores obtidos em culturas tratadas em duplicatas foram expressos como percentagens daqueles obtidos em culturas controle tratadas com PBS Ca²⁺.

4. RESULTADOS.

4.1. SOBREVIVENCIA DE CELULAS V79/M8 TRATADAS COM VIOLACEINA, Br-VIOLACEINA, METILOL-VIOLACEINA, NIFURTIMOX E BENZNIDAZOLE.

O efeito de um determinado agente na viabilidade reprodutiva de células em cultura, pode ser demonstrado pela perda da capacidade destas de formarem colônias, após tratamento com o agente em questão.

A figura 1 mostra a letalidade de células V79/M8 tratadas com concentrações crescentes de Violaceína. O D_{37} (onde um fóton é capaz de eliminar 37% das células) corresponde à dose de $1,545 \times 10^{-5}$ M.

A figura 2 mostra a letalidade de células V79/M8 tratadas com o derivado sintético de Violaceína, a Bromo-Violaceína. O D_{37} corresponde à dose de $1,151 \times 10^{-5}$ M.

A figura 3 nos mostra a letalidade de células V79/M8 tratadas com o segundo derivado sintético de Violaceína, o Metilol-Violaceína. O D_{37} corresponde a dose de $3,0 \times 10^{-5}$ M

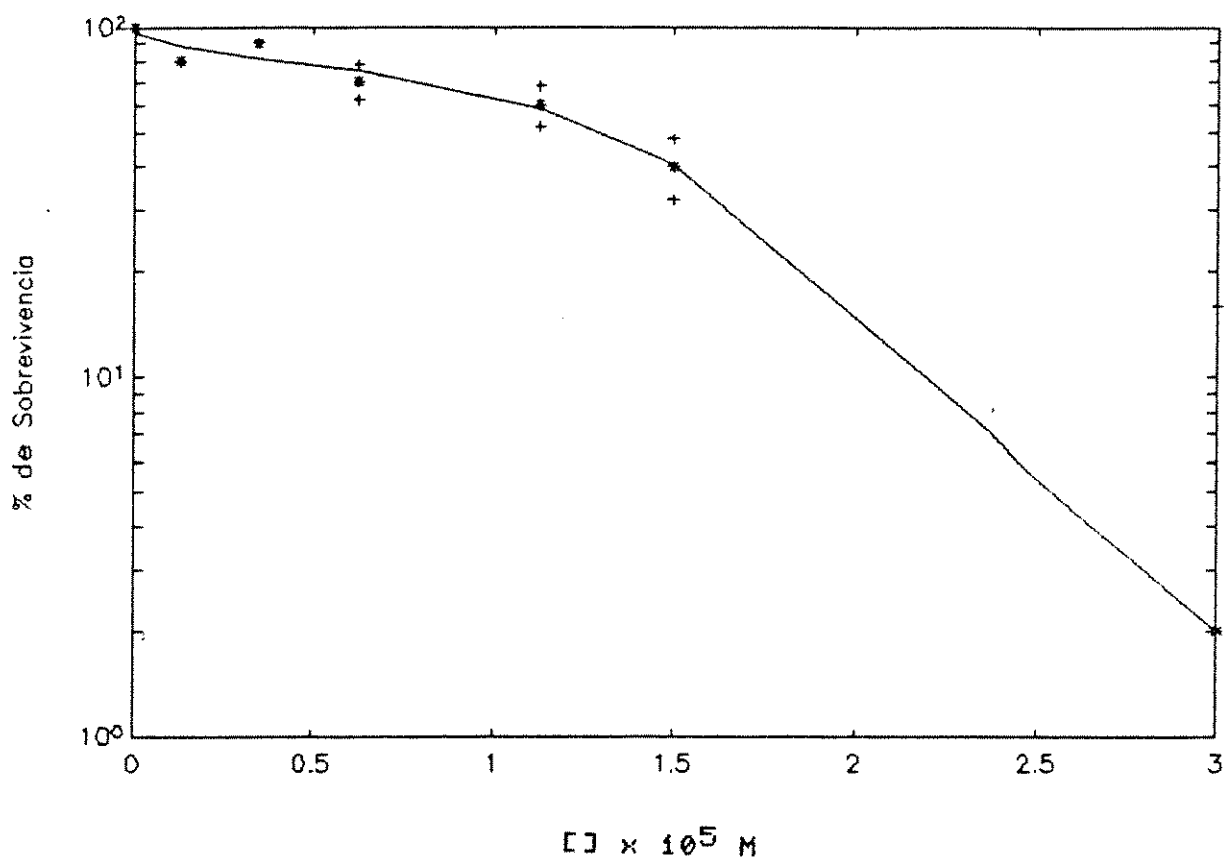


FIGURA 1 : CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79/MB TRATADAS COM VIOLACEÍNA.

As células (300 células/placa de 5cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Violaceína por 30 minutos a 37°C e as colônias formadas contadas após 7 dias de crescimento como descrito em Material e Métodos (item 3.5). As barras correspondem aos valores médios com respectivos desvios da média de dados de 2 experimentos em duplicatas.

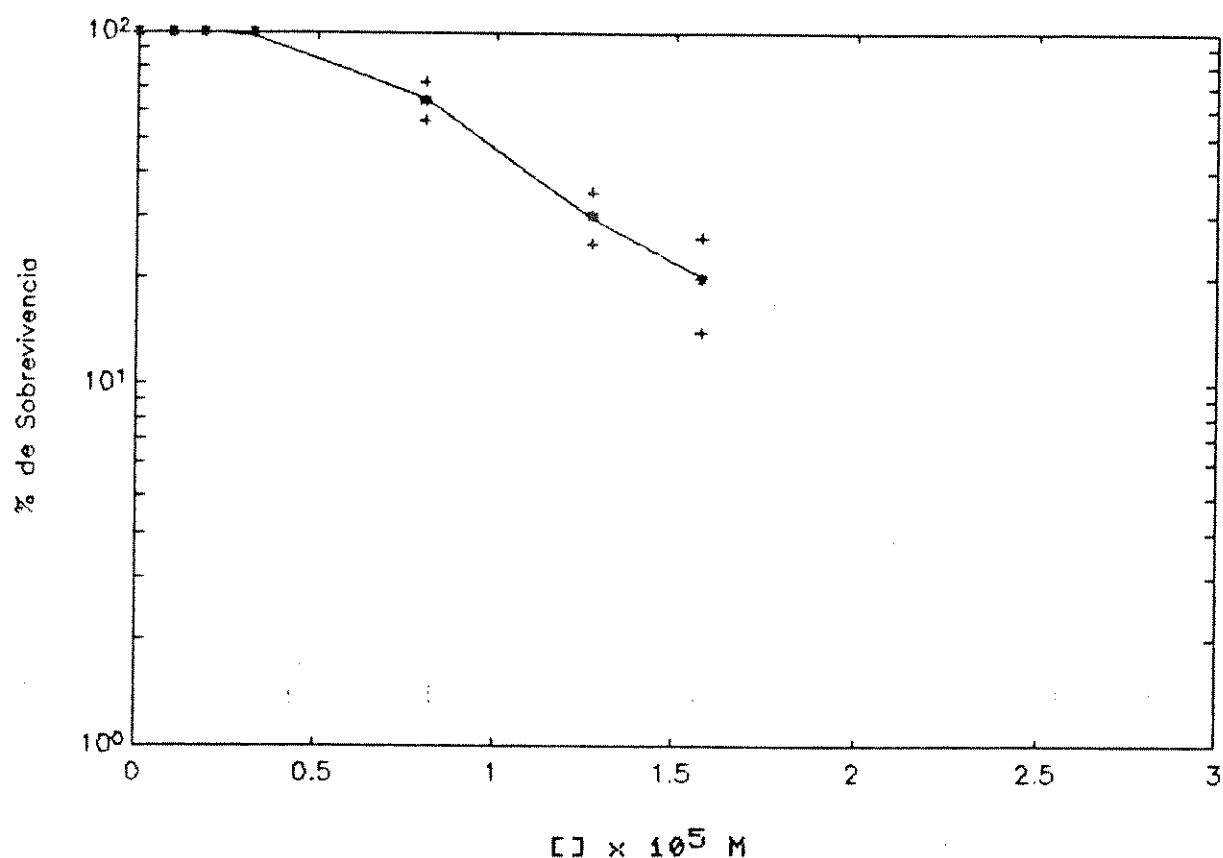


FIGURA 2 : CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79/MB TRATADAS COM BROMO-VIOLACEÍNA.

As células (300 células/placa de 5cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Bromo-Violaceína por 30 minutos a 37°C e as colônias formadas contadas após 7 dias de crescimento como descrito em Material e Métodos (item 3.5). As barras correspondem aos valores médios com respectivos desvios da média de dados de 2 experimentos em duplicatas.

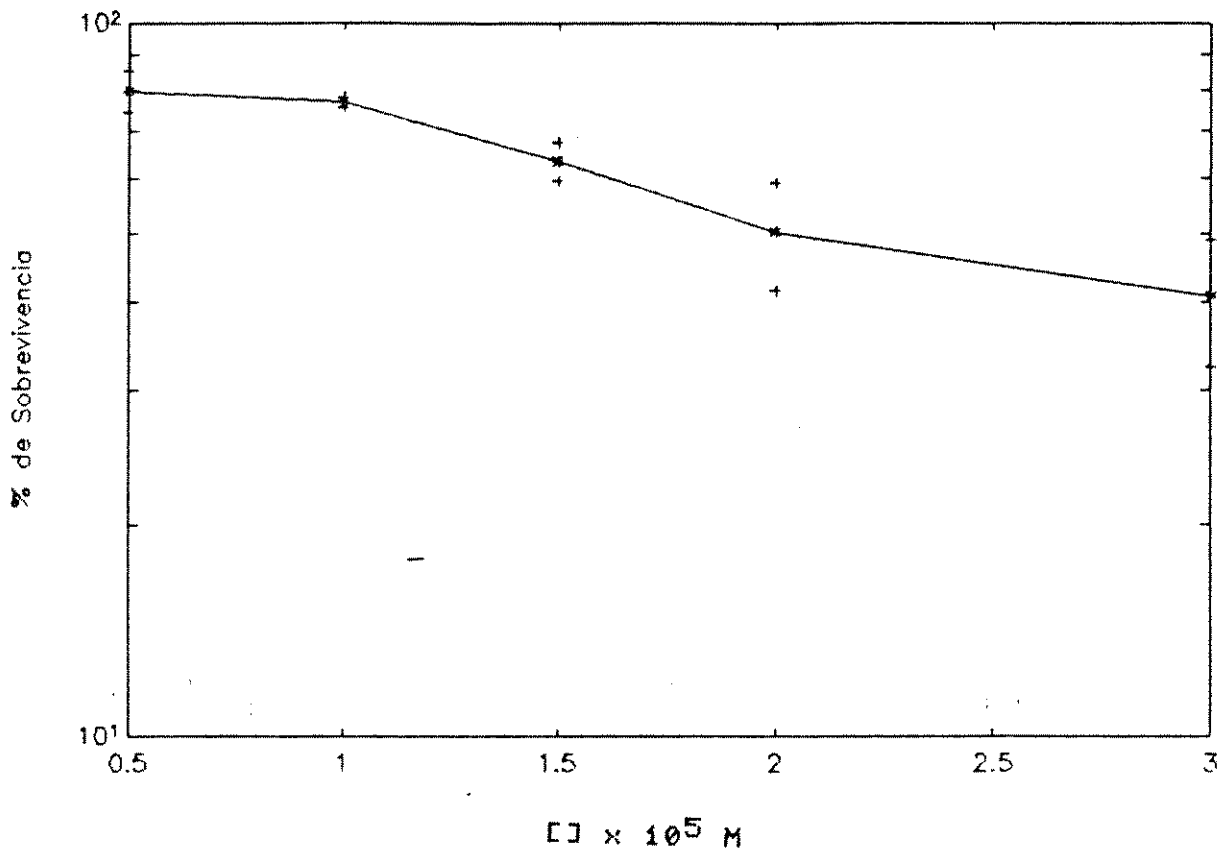


FIGURA 3 : CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM METILOL-VIOLACEÍNA.

As células (300 células/placa de 5cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Metilol-Violaceína por 30 minutos a 37°C e as colônias formadas contadas após 7 dias de crescimento como descrito em Material e Métodos (item 3.5). As barras correspondem aos valores médios com respectivos desvios da média de dados de 2 experimentos em duplicatas.

A figura 4 mostra os valores obtidos de Violaceína e seus derivados na sobrevivência de células V79/M8 tratadas com as mesmas concentrações destes agentes.

A figura 5 nos mostra o comportamento de Nifurtimox e Benznidazole em células V79/M8 através do parâmetro de D_{37} , quando as células foram tratadas nas mesmas concentrações de Violaceína e derivados.

4.2. AÇÃO DE VIOLACEÍNA E SEUS DERIVADOS NA REPLICAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS V79/M8.

Após se detectar o efeito de Violaceína e seus derivados sintéticos na sobrevivência celular, procurou-se verificar se esses agentes exerceriam algum efeito ao nível molecular, como por exemplo, parada na replicação do DNA. Essa avaliação foi feita utilizando-se radioisótopos (^3H -Tdr) como descrito no item 6.

A figura 6 mostra a taxa de inibição da síntese de DNA, frente ao tratamento com Violaceína em doses crescentes com células V79/M8. A dose que representou o ID_{50} (dose capaz de inibir 50% da taxa de síntese de DNA) para Violaceína foi de $13,36 \times 10^{-5} \text{ M}$.

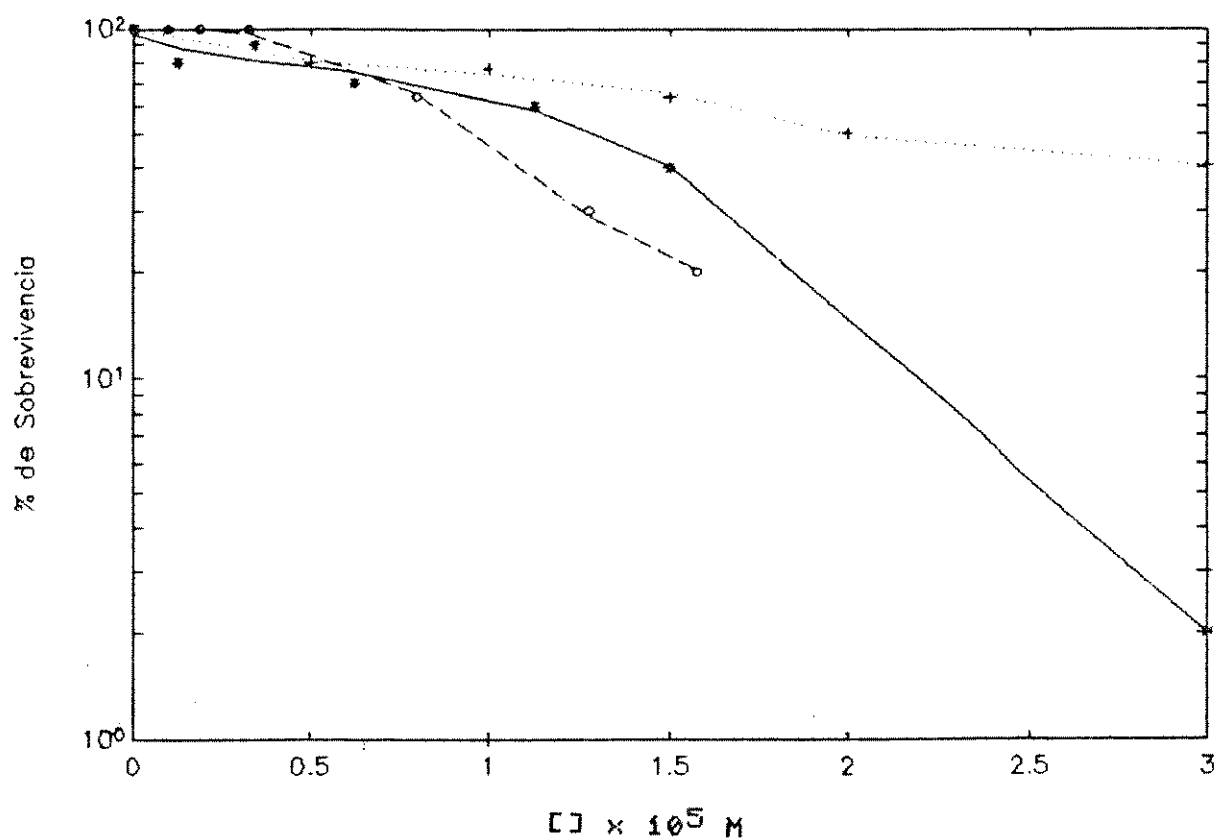


FIGURA 4 : CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79/MB TRATADAS COM VIOLACEÍNA E SEUS DERIVADOS SINTÉTICOS.

As células (300 células/placa de 5,0 cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Violaceína (*), Bromo-Violaceína (o) e Metilol-Violaceína (+) nas mesmas condições das figs 1, 2 e 3.

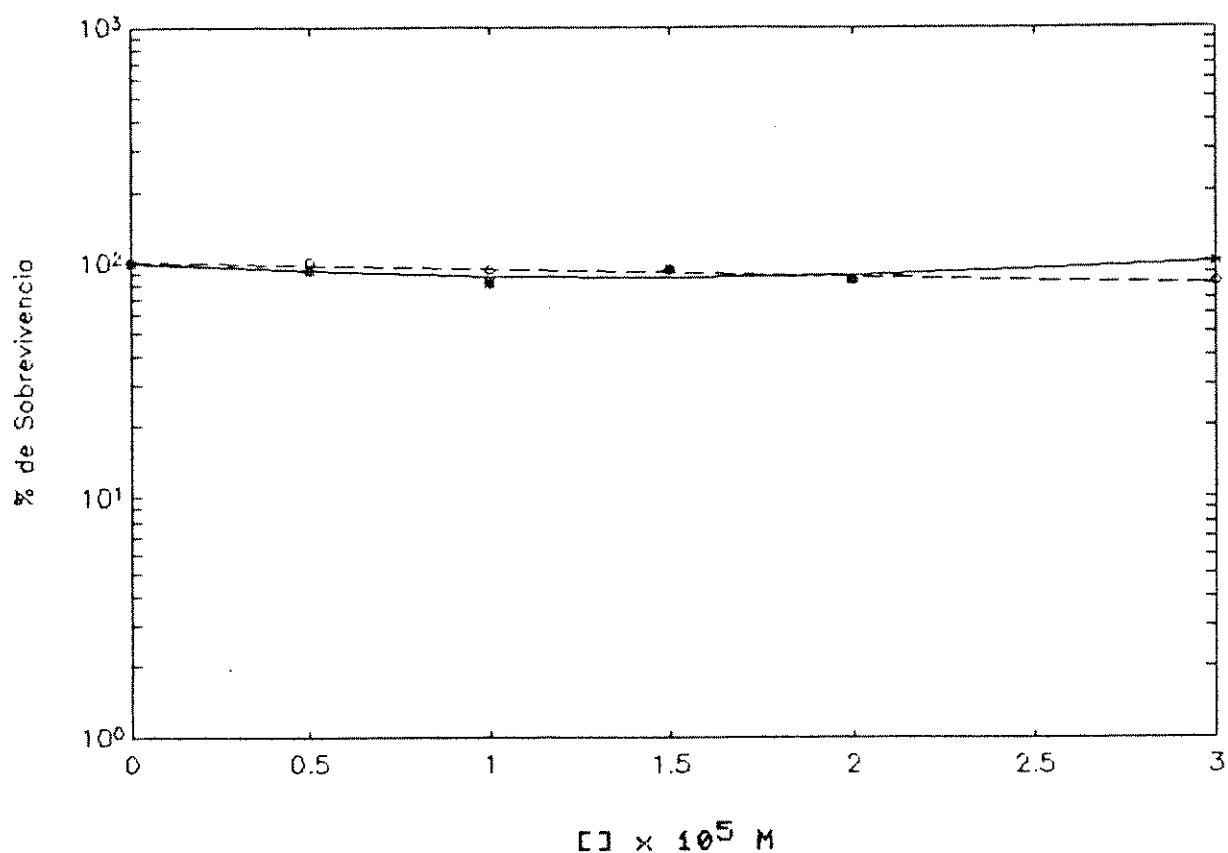


FIGURA 5 : CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM NIFURTIMOX e BENZNIDAZOLE.

As células (300 células/placa de 5cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Nifurtimox (○) e Benznidazole (●) por 30 minutos a 37°C, e as colônias formadas contadas após 7 dias de crescimento como descrito em Material e Métodos (item 3.5). As barras correspondem aos valores médios com respectivos desvios da média de dados de 2 experimentos em duplicatas.

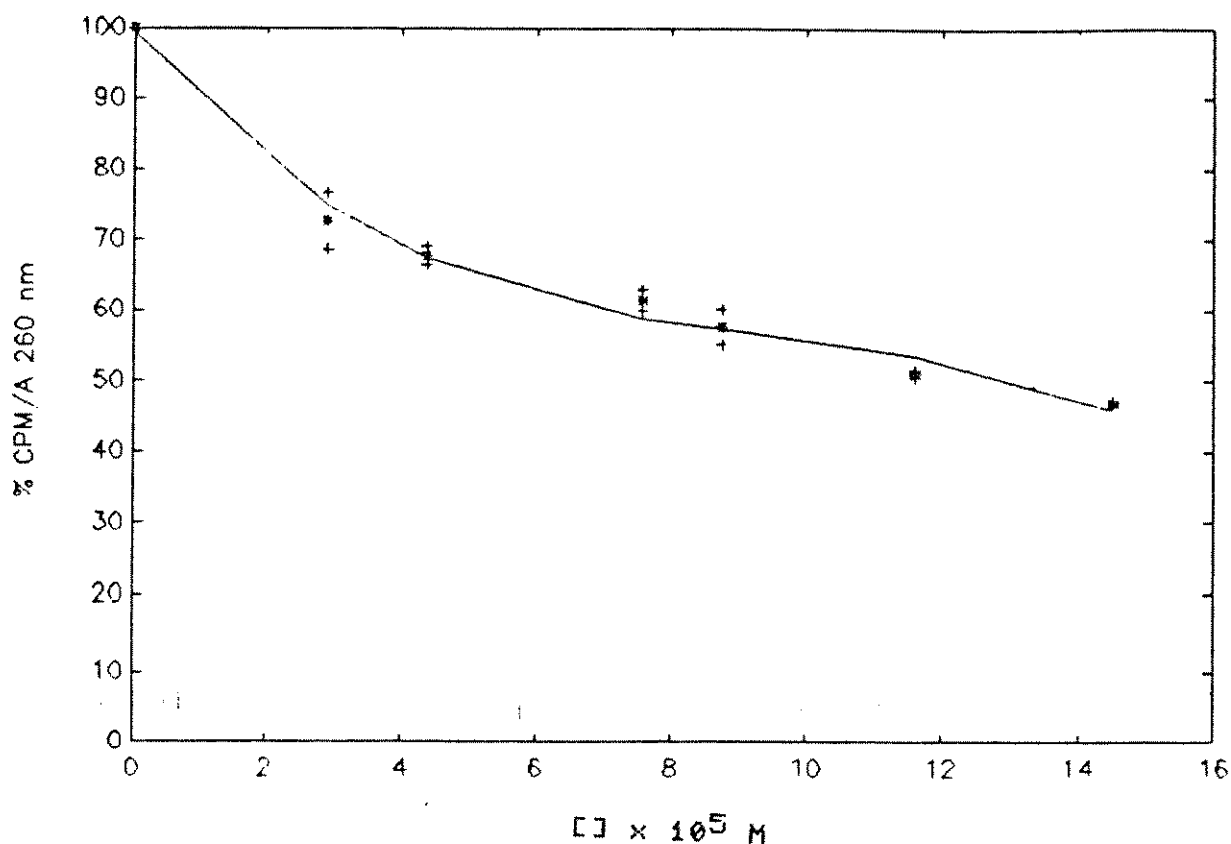


FIGURA 6 : TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM VIOLACEÍNA.

Células em crescimento exponencial (50.000 células/placa de 2,5 cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Violaceína por 30 minutos a 37°C e posteriormente incubadas em meio de cultura contendo ^3H -timidina (10 $\mu\text{Ci/ml}$) por um período de 30 minutos. A quantidade de ^3H -timidina incorporada no material celular ácido insolúvel foi utilizada como atividade de síntese de DNA (item 3.6). A razão entre a radioatividade e absorbância de cada amostra foi tomada como expressão da síntese de DNA (cpm/A₂₆₀ nm). Os dados foram expressos em porcentagem relativa à síntese do controle (100 %), o qual foi exposto somente ao tampão. Os desvios apresentados referem-se, ao desvio da média da porcentagem de síntese de DNA de dois experimentos independentes feitos em triplicatas.

A figura 7 mostra a taxa de inibição da síntese de DNA de células V79/M8 tratadas com doses crescentes do derivado Bromo-Violaceína. A dose que correspondeu ao ID_{50} para este agente foi $5,75 \times 10^{-5}$ M.

A figura 8 mostra a inibição da síntese de DNA de células V79/M8 frente ao tratamento com o derivado Metilol-Violaceína. Não foi possível obter nestas concentrações o valor de ID_{50} . Os efeitos dos compostos podem ser melhor visualizados através da figura 9. Apenas 15 % de inibição foi detectado no tratamento das células com Metilol-Violaceína.

Já a figura 10 mostra a ação de Nifurtimox na inibição de síntese de DNA em células V79/M8 tratadas com concentrações iguais aquelas de Violaceína e derivados. Não foi possível obter nestas condições o valor de ID_{50} .

A figura 11 mostra o efeito de Benznidazole na síntese de DNA. Pode-se observar através da figura que não houve inibição significativa que permitisse determinar ID_{50} na taxa de síntese de DNA das células tratadas com este agente.

A dose que produziu uma inibição maior da taxa de síntese de DNA para ambos, Nifurtimox e Benznidazole foi de 10^{-4} M, e isso em termos de porcentagem representou 20 % e 15 % respectivamente. (Fig. 12).

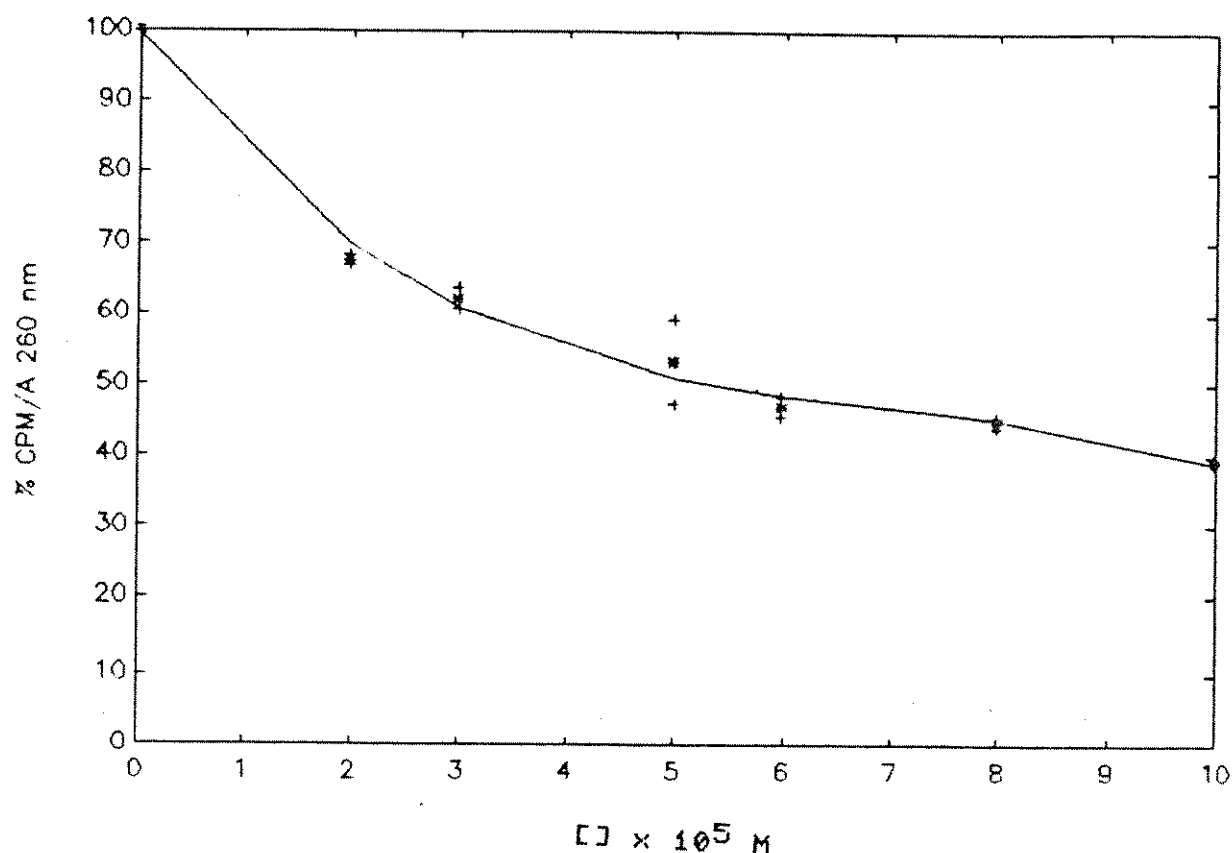


FIGURA 7 : TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/MB TRATADAS COM BROMO-VIOFACEÍNA.

Células em crescimento exponencial (50.000 células/placa de 2,5 cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Bromo-Violaceína por 30 minutos a 37°C e posteriormente incubadas em meio de cultura contendo ³H-timidina (10 uCi/ml) por um período de 30 minutos. A quantidade de ³H-timidina incorporada no material celular ácido insolúvel foi utilizada como atividade de síntese de DNA (item 3.6) A razão entre a radioatividade e absorbância de cada amostra foi tomada como expressão da síntese de DNA (cpm/A₂₆₀ nm). Os dados foram expressos em porcentagem relativa à síntese do controle (100 %), o qual foi exposto somente ao tampão. Os desvios apresentados, referem-se ao desvio da média da porcentagem de síntese de DNA de dois experimentos independentes feitos em triplicatas..

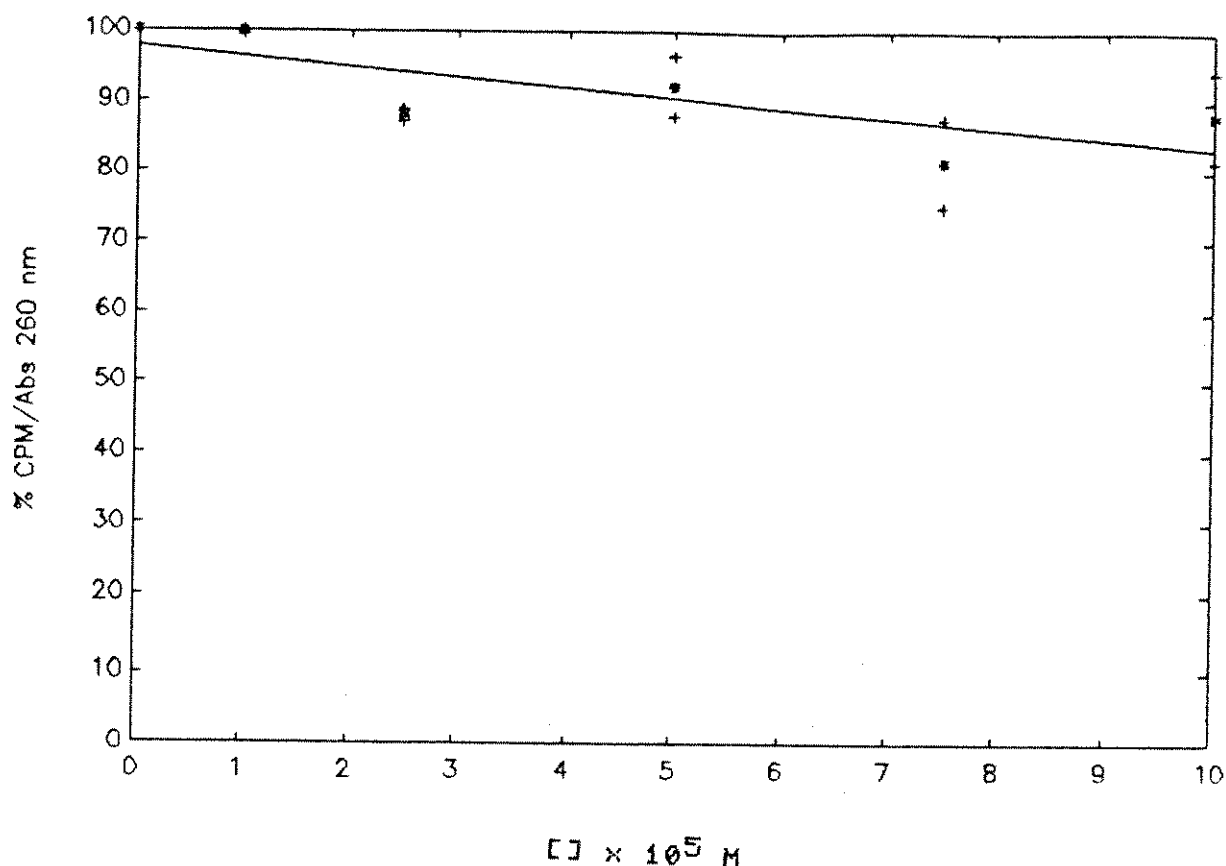


FIGURA 8 : TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/MB TRATADAS COM METILOL-VIOLACEÍNA.

Células em crescimento exponencial (50.000 células/placa de 2,5 cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Metilol-Violaceína por 30 minutos a 37°C e posteriormente incubadas em meio de cultura contendo ³H-timidina (10 uCi/ml) por um período de 30 minutos. A quantidade de ³H-timidina incorporada no material celular ácido insolúvel foi utilizada como atividade de síntese de DNA (item 3.6). A razão entre a radioatividade e absorbância de cada amostra foi tomada como expressão da síntese de DNA (cpm/A₂₆₀ nm). Os dados foram expressos em porcentagem relativa à síntese do controle (100 %), o qual foi exposto somente ao tampão. Os desvios apresentados, referem-se ao desvio da média da porcentagem de síntese de DNA de dois experimentos independentes feitos em triplicatas.

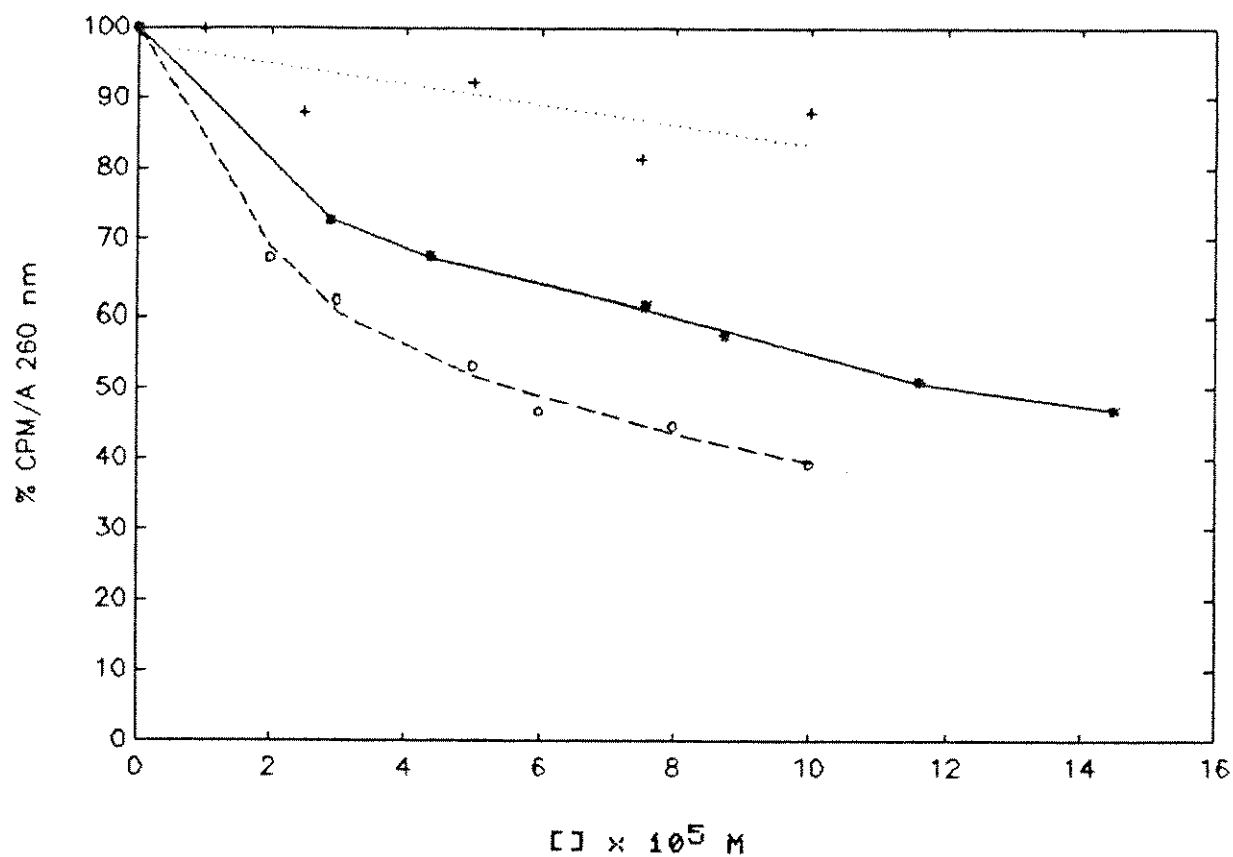


FIGURA 9 : TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM VIOLACEÍNA E SEUS DERIVADOS SINTÉTICOS.

Células em crescimento exponencial foram tratadas com diferentes concentrações de Violaceína (*), Bromo-Violaceína (o) e Metilol-Violaceína (+) nas mesmas condições das figs 6, 7 e 8.

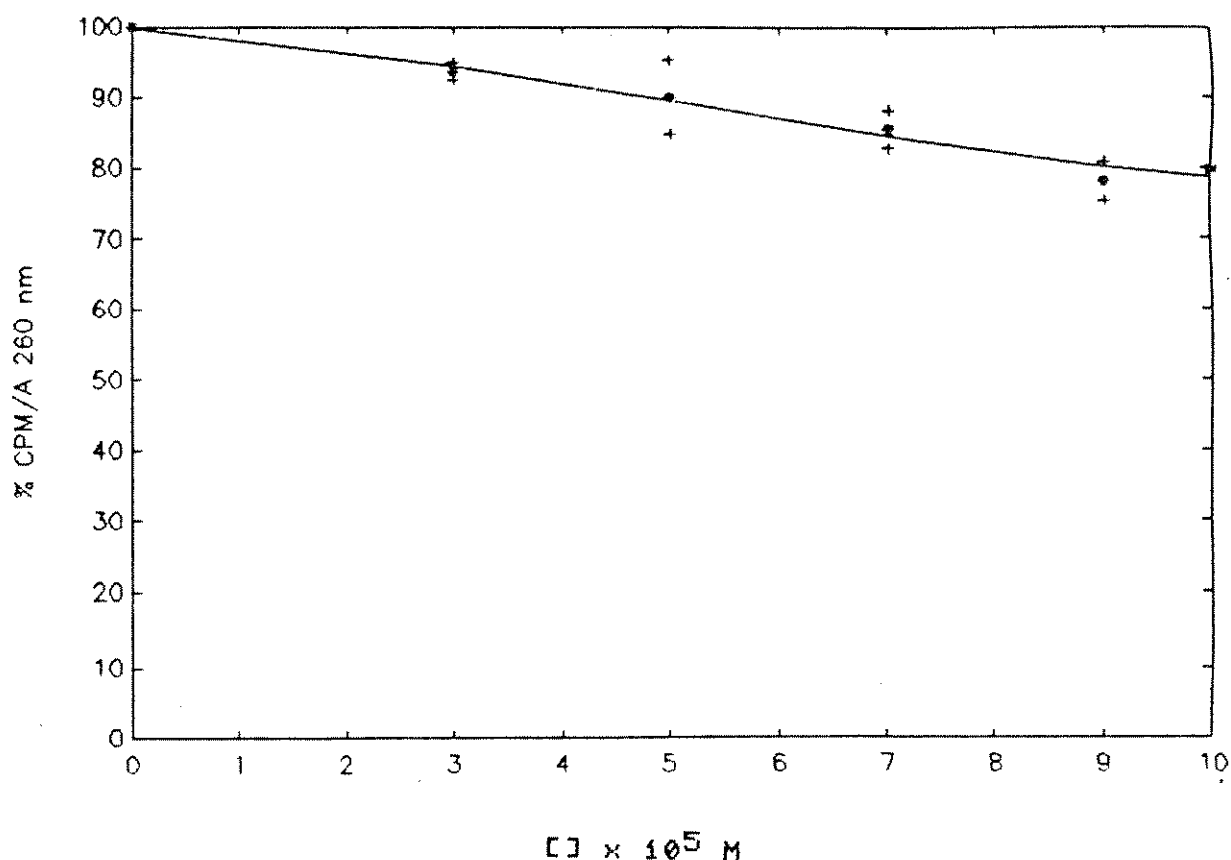


FIGURA 10 : TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/MB TRATADAS COM NIFURTIMOX.

Células em crescimento exponencial (50.000 células/placa de 2,5 cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Nifurtimox por 30 minutos a 37°C e posteriormente incubadas em meio de cultura contendo ³H-timidina (10 uCi/ml) por um período de 30 minutos. A quantidade de ³H-timidina incorporada no material celular ácido insolúvel foi utilizada como atividade de síntese de DNA (item 3.6). A razão entre a radioatividade e absorbância de cada amostra foi tomada como expressão da síntese de DNA (cpm/A₂₆₀ nm). Os dados foram expressos em porcentagem relativa à síntese do controles (100 %), os quais foram expostos somente ao tampão. Os desvios apresentados, referem-se aos desvios da média da porcentagem de síntese de DNA de dois experimentos independentes feitos em triplicatas.

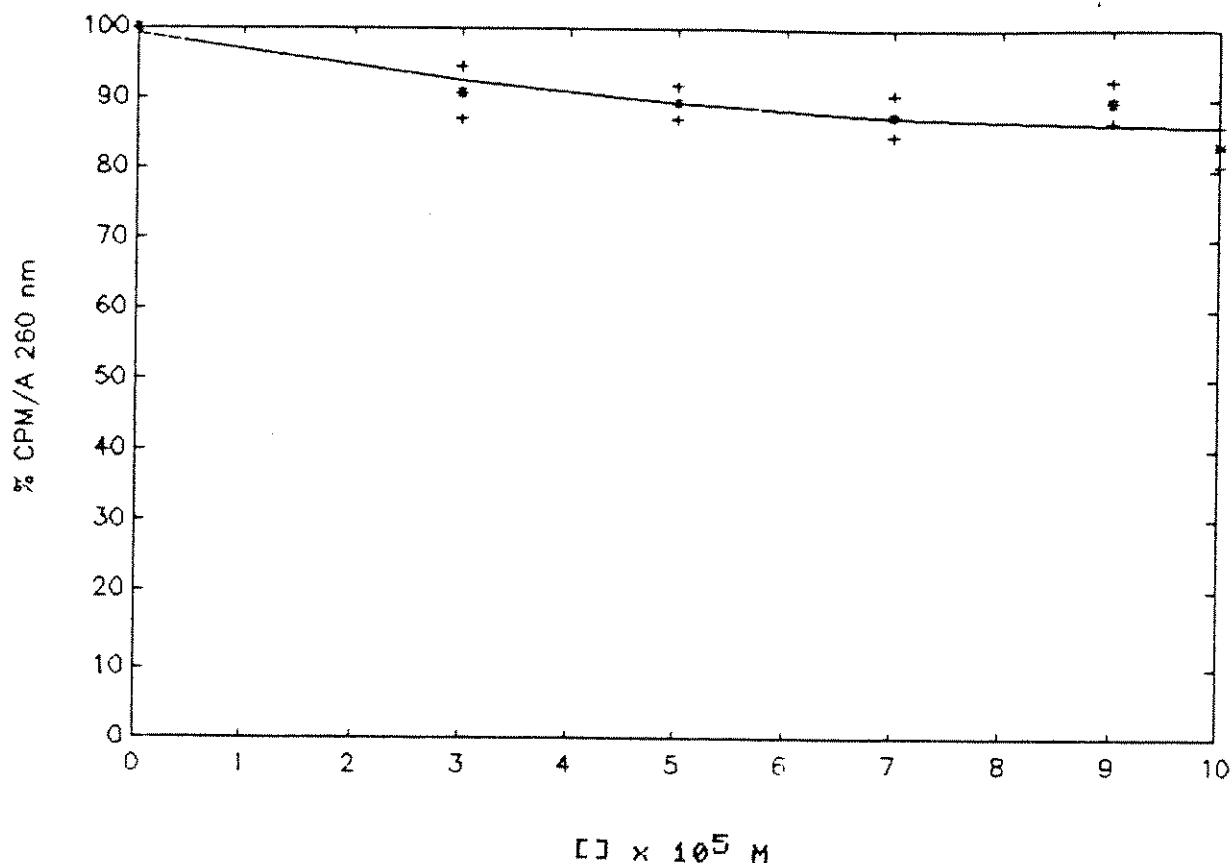


FIGURA 11 : TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/MB TRATADAS COM BENZNIDAZOLE.

Células em crescimento exponencial (50.000 células/placa de 2,5 cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Benznidazole por 30 minutos a 37°C e posteriormente incubadas em meio de cultura contendo ^3H -timidina (10 $\mu\text{Ci/ml}$) por um período de 30 minutos. A quantidade de ^3H -timidina incorporada no material celular ácido insolúvel foi utilizada como atividade de síntese de DNA (item 3.6). A razão entre a radioatividade e absorbância de cada amostra foi tomada como expressão da síntese de DNA (cpm/A₂₆₀ nm). Os dados foram expressos em porcentagem relativa à síntese do controles (100 %), os quais foram expostos somente ao tampão. Os desvios apresentados, referem-se aos desvios da média da porcentagem de síntese de DNA de dois experimentos independentes feitos em triplicatas.

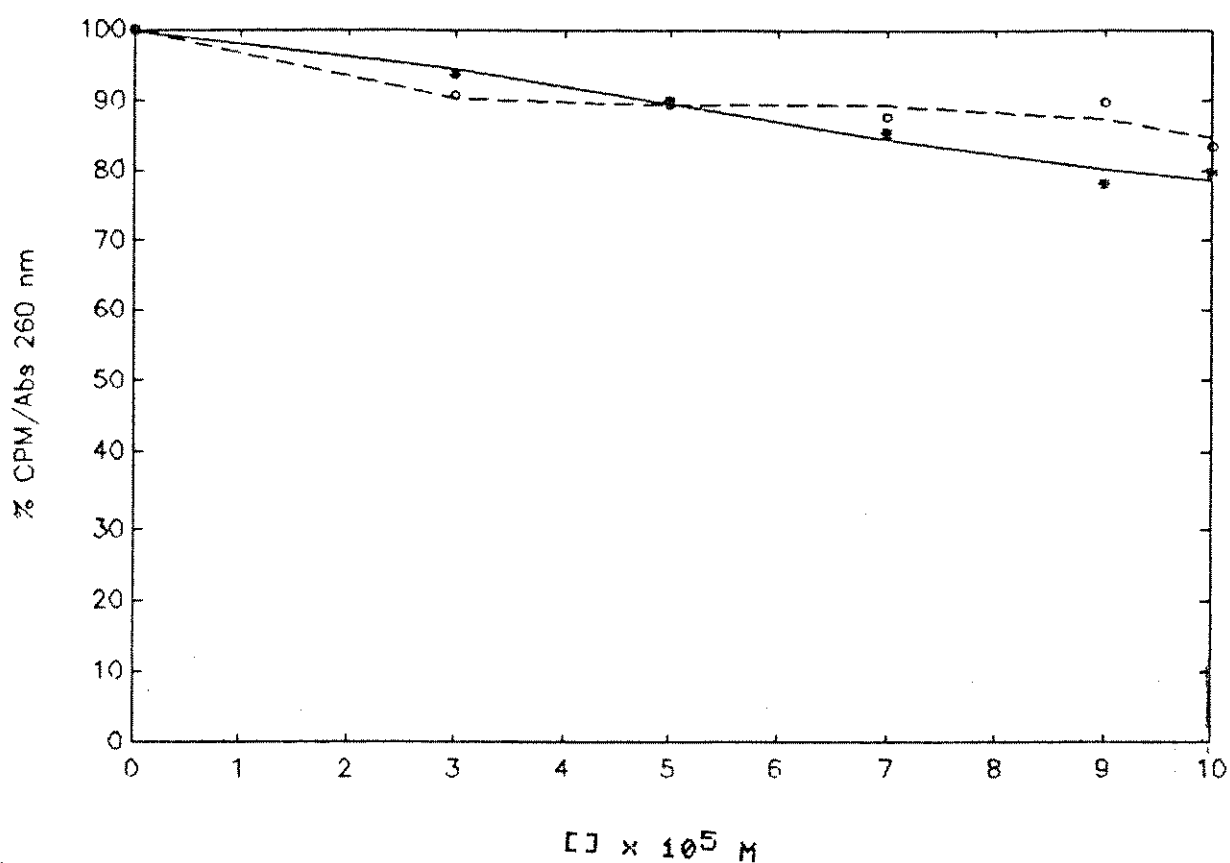


FIGURA 12 : TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/MB TRATADAS COM NITROCOMPOSTOS.

Células em crescimento exponencial (50.000 células/placa de 2,5 cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Nifurtimox (*) e Benznidazole (o) nas mesmas condições das figs 10 e 11.

4.3. CINÉTICA DE RECUPERAÇÃO DA SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM VIOLACEÍNA E BR-VIOLACEÍNA.

Os resultados anteriores mostraram que a replicação do DNA de células V79/M8 tratadas com Violaceína e Br-Violaceína foi inibida imediatamente após o tratamento com estes agentes.

A fim de melhor compreender o mecanismo envolvido na inibição da síntese de DNA celular por Violaceína e pelo derivado Br-Violaceína os quais se mostraram mais tóxicos, realizamos experimentos para verificarmos se caso ocorreria uma recuperação após algumas horas ou não, da síntese de DNA aos níveis normais.

As figuras 13 e 14 nos mostram que após o tratamento com uma dose de $1,16 \times 10^{-5}$ M para Violaceína, e 5×10^{-5} M para Br-Violaceína, que correspondem a uma inibição de 50 %, atingiu-se uma inibição máxima da síntese de DNA 90 minutos após o tratamento. Posteriormente, para ambos os agentes não observou-se recuperação de síntese após 6 horas, verificando-se uma inibição de aproximadamente 50 % em relação aos níveis normais.

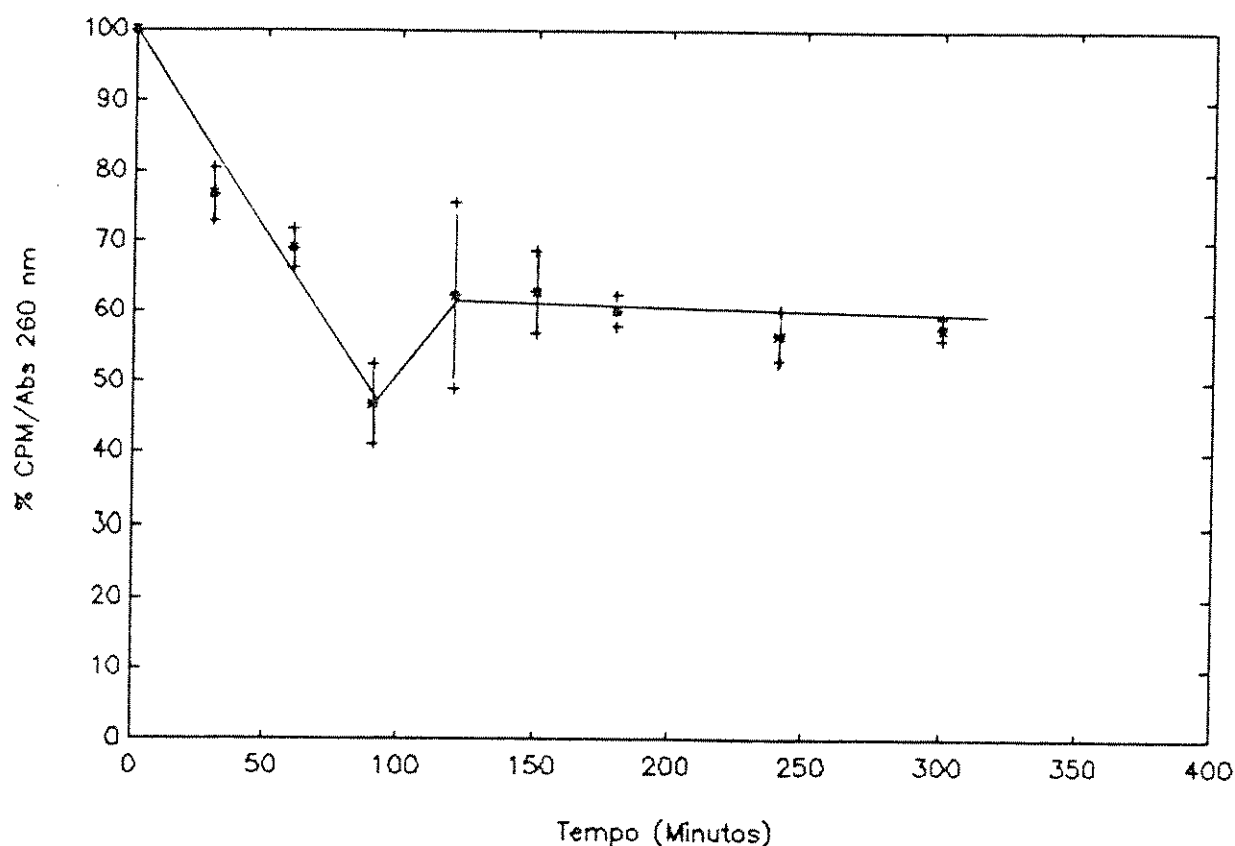


FIGURA 13 : CINÉTICA DE RECUPERAÇÃO DO EFEITO DE INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE DNA INDUZIDA POR VIOLACEÍNA.

Células V79/M8 em fase exponencial de crescimento (50.000 células/placa de 2,5 cm de diâmetro) foram tratadas com $1,16 \times 10^{-5}$ M de Violaceína (PBS-A, 30 minutos, 37°C). A marcação com ^3H -timidina foi realizada após intervalos crescentes de recuperação. Foi feito um controle para cada tempo de recuperação. A taxa de síntese de DNA foi medida como descrito em Material e Métodos (item 3.6). O experimento foi feito em duplicatas, sendo apresentados os desvios da média.

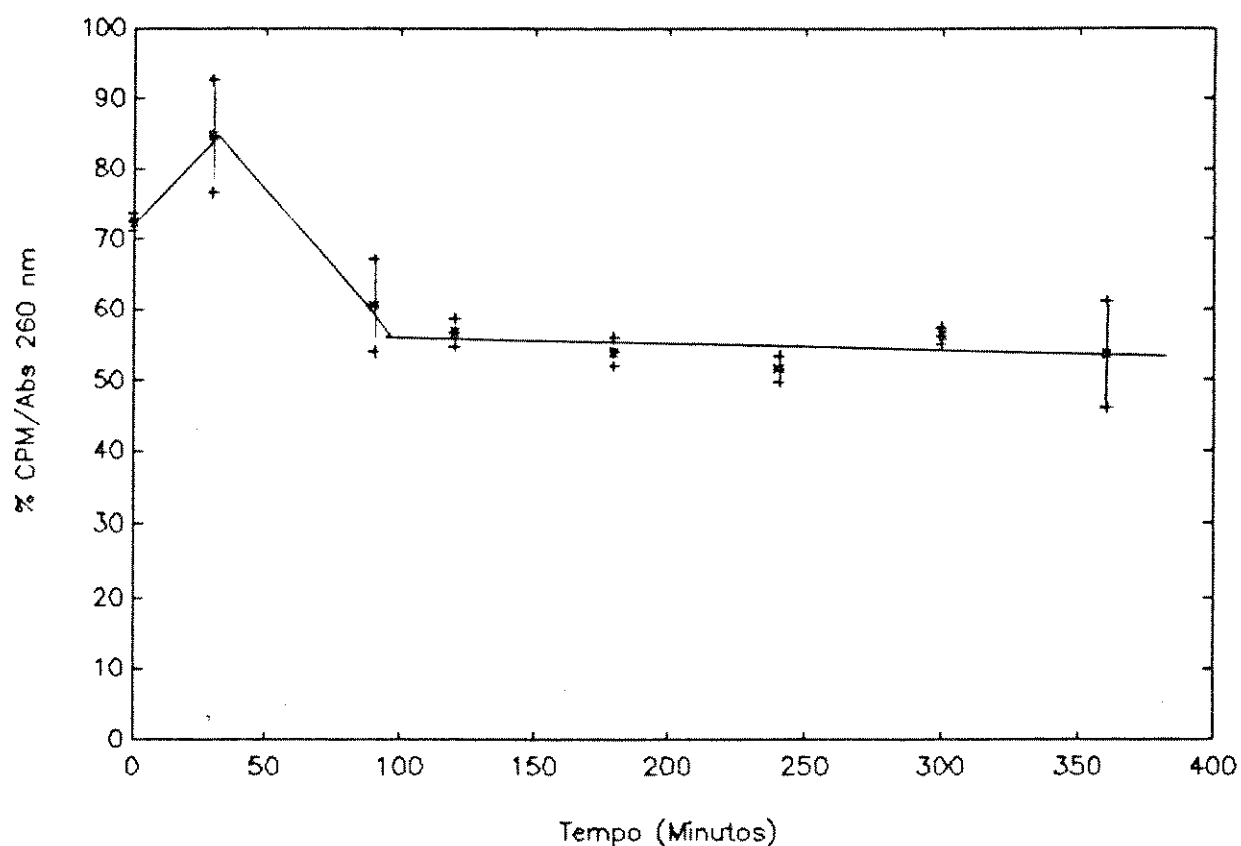


FIGURA 14 : CINÉTICA DE RECUPERAÇÃO DO EFEITO DE INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE DNA INDUZIDA POR BROMO-VIOFACEÍNA.

Células V79/M8 em fase exponencial de crescimento (50.000 células/placa de 2,5 cm de diâmetro) foram tratadas com $5 \times 10^{-5}M$ de Bromo-Violaceína (PBS-A, 30 minutos, 37°C). A marcação com 3H -timidina foi realizada após intervalos crescentes de recuperação. Foi feito um controle para cada tempo de recuperação. A taxa de síntese de DNA foi medida como descrito em Material e Métodos (item 3.6). O experimento foi feito em duplicatas, sendo apresentados os desvios da média.

4.4. ESTUDOS DE PROTEÇÃO DO EFEITO LETAL NA VIABILIDADE CELULAR E NA INIBIÇÃO DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/M8 EXPOSTAS À VIOLACEÍNA.

Neste estudo procuramos verificar a ação de Violaceína na presença de Catalase, uma enzima antioxidante (Lehninger, 1985). Esta enzima é frequentemente utilizada nos estudos moleculares de vários agentes, com o objetivo de investigar a formação e a participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos efeitos deletérios observados.

A figura 15 mostra o efeito de proteção conferido pela Catalase frente ao efeito tóxico de Violaceína para a sobrevivência celular. Observou-se um D_{37} de $3,0 \times 10^{-5}$ M.

Com a finalidade de verificarmos uma provável participação do peróxido de hidrogênio na inibição da síntese de DNA produzida por Violaceína, realizamos os estudos de proteção com Catalase. A figura 16 nos mostra um ID_{50} de 16×10^{-5} M para células V79/M8 tratadas com Violaceína na presença de Catalase.

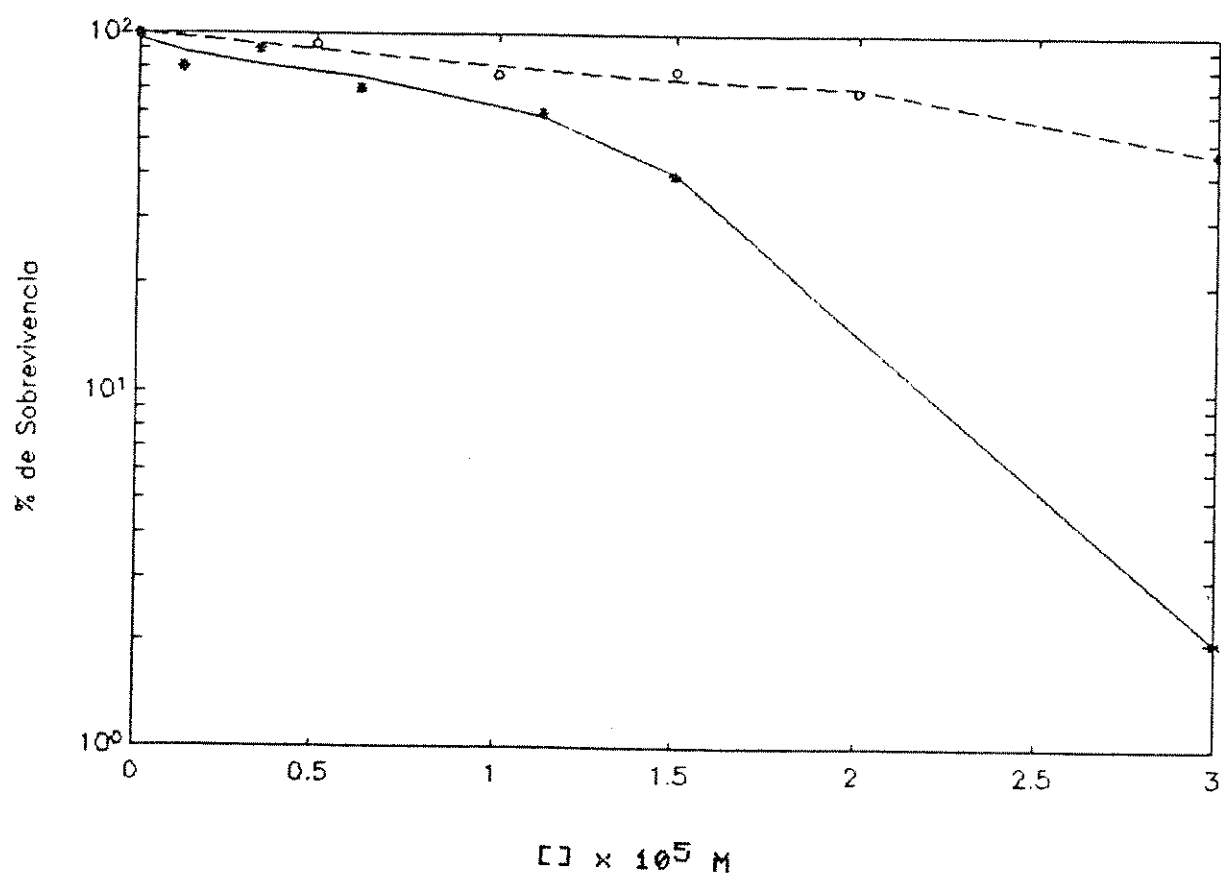


FIGURA 15 : CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM VIOLACEÍNA NA PRESENÇA DE CATALASE.

As células (300 células/placa de 5,0 cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Violaceína (*), e Violaceína na presença de Catalase (250 U/ml) (o) por 30 minutos a 37°C e as colônias formadas contadas após 7 dias de crescimento como descrito em Material e Métodos (item 3.5).

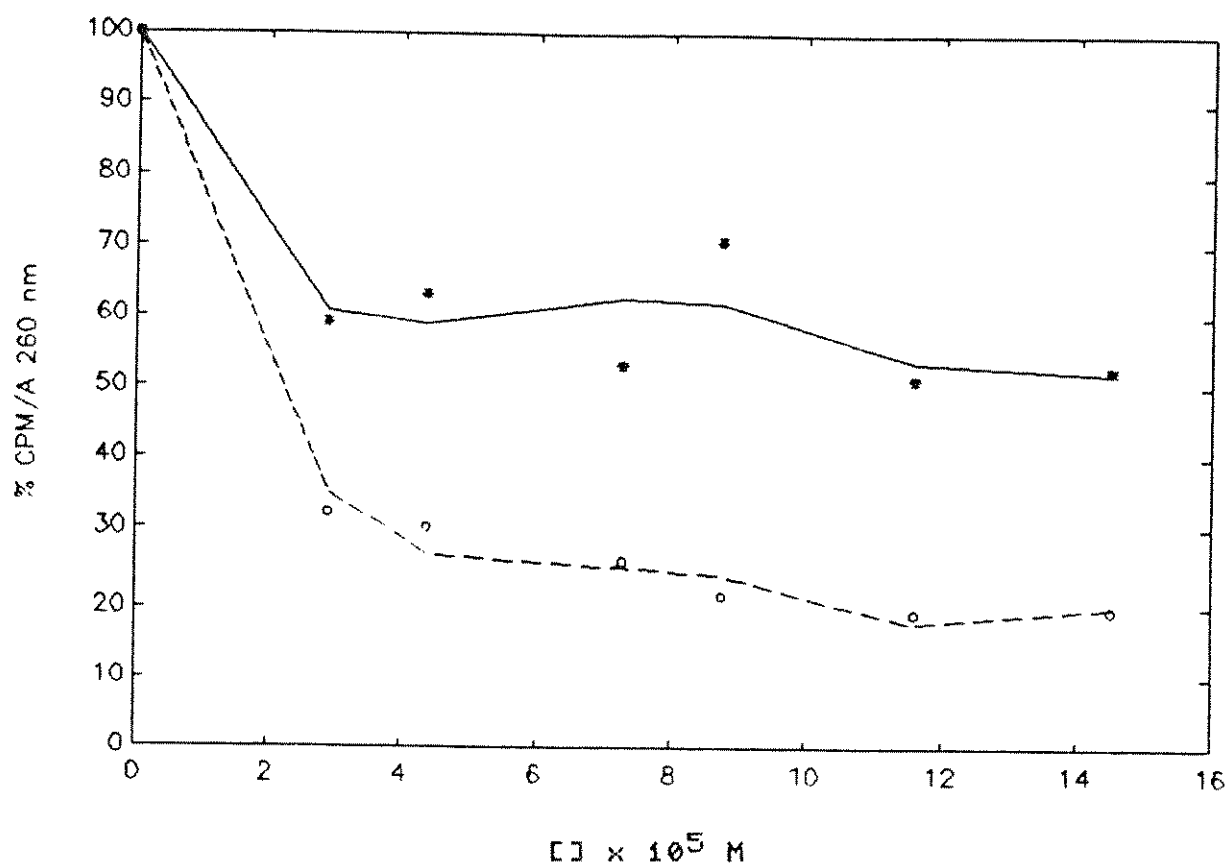


FIGURA 16 : TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/MB TRATADAS COM VIOLACEÍNA NA PRESENÇA DE CATALASE.

Células em crescimento exponencial (10.000 / placa) foram tratadas com diferentes concentrações de Violaceína (o) e Violaceína na presença de Catalase (*) (250 U/ml) por 30 minutos a 37°C e posteriormente incubadas em meio de cultura contendo ³H-timidina (10 uCi/ml) por um período de 30 minutos. A quantidade de ³H-timidina incorporada no material celular ácido insolúvel foi utilizada como atividade de síntese de DNA (item 3.6). A razão entre a radioatividade e absorbância de cada amostra foi tomada como expressão da síntese de DNA (cpm/A₂₆₀ nm). Os dados foram expressos em porcentagem relativa à síntese do controles (100 %), os quais foram expostos somente ao tampão.

5.DISSCUSSÃO

5.1. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE DE VIOLACEÍNA E DERIVADOS.

Neste trabalho, o ponto de partida foi estudarmos os efeitos de Violaceína sobre os processos de viabilidade celular e replicação do DNA na linhagem celular V79/M8.

Este interesse nasceu após verificar-se em nossos laboratórios, que a Violaceína na faixa de dose de 10 a 40 ug/ml, inibia o crescimento do flagelado *L. cruzi* (Durán e col., 1987). Sendo assim, nosso objetivo consistiu em avaliar os efeitos citotóxicos deste composto com ação tripanocida comprovada, na tentativa de encontrarmos um agente potencial para o tratamento da enfermidade de Chagas.

Como apresentado na figura 1, a Violaceína se mostrou altamente tóxica para as células V79/M8. Este resultado nos levou a testar dois derivados sintéticos deste composto : Bromo-Violaceína e Metilol-Violaceína. Estes testes foram feitos na tentativa de encontrarmos um derivado menos tóxico para as células, que fosse solúvel em água e que tivesse ação inibitória, tanto na motilidade do *L. cruzi*, quanto no seu crescimento (Haun e col., 1990).

Os resultados por nós obtidos entretanto, nos mostraram que Br-Violaceína apresenta um D₃₇ semelhante ao apresentado por Violaceína. (Fig. 4). Entretanto, em testes realizados em nossos laboratórios, Violaceína após 80 horas de cultura de *I. cruzi* (forma epimastigota, cepa Tulahuen) inibiu 70 % da motilidade do flagelado, enquanto Bromo Violaceína inibe ao final do mesmo tempo, apenas 50 % .

Já as células V79/M8 tratadas com Metilol-Violaceína nas mesmas concentrações usadas para Violaceína e Br-Violaceína, se mostraram mais resistentes aos efeitos letais deste derivado, apresentando um D₃₇ de $3,0 \times 10^{-5}$ M. (Fig. 3). No entanto, este composto se mostra como o mais efetivo tanto na inibição de crescimento do flagelado como da motilidade. Metilol Violaceína ao final de 48 horas inibe 100 % a motilidade do flagelado (Tabelas 1 e 2 pag. 11).

Podemos notar que a ação de imobilização do flagelo, bem como de mortalidade do *I. cruzi* não estão relacionados com o efeito tóxico de Violaceína e seus derivados em células V79/M8, já que o Metilol Violaceína, composto menos tóxico é o mais efetivo contra as formas epimastigotas deste protozoário.

Após os experimentos de sobrevivência celular para detectarmos o efeito de Violaceína e seus derivados sintéticos na viabilidade reprodutiva de células V79/M8, procuramos verificar se esses agentes seriam capazes de produzir algum efeito ao nível

molecular, como por exemplo, inibição da síntese de DNA.

A inibição do processo de replicação do DNA consiste numa resposta celular genérica e imediata à presença de lesões nessa molécula, induzidas por agentes químicos ou físicos (Painter, 1977).

Na figura 9, pode-se observar que Violaceína e seus derivados usados na mesma faixa de concentração, inibiram a síntese de DNA de uma forma dose dependente, sendo que Bromo-Violaceína foi o maior inibidor, apresentando um ID_{50} de $5,75 \times 10^{-5}$ M.

A inibição da síntese semiconservativa do DNA em células eucarióticas, pode resultar de diferentes tipos de perturbações no processo de replicação (Hall e Mount, 1981). Ela pode ser causada por um bloqueio da iniciação das unidades de replicação, os replicons, pelo bloqueio da progressão dos pontos de crescimento do DNA já existentes, e pela redução da velocidade de deslocamento da "forquilha de replicação" (Painter e Howard, 1982). Incluem também alterações das enzimas envolvidas no próprio processo de síntese (Friedberg, 1985).

Assim, através das figuras 6 e 7 observa-se um comportamento bifásico da inibição da síntese de DNA por Violaceína e Bromo-Violaceína. Essa resposta bifásica observada mostra um efeito intenso em doses baixas, ocasionado pelo

bloqueio da iniciação de replicons, e um aumento pequeno da inibição em doses mais elevadas ocasionado pelo impedimento do progresso da forquilha de replicação. Este fato assemelha-se ao obtido com células eucarióticas tratadas com radiação ionizante (Painter e Young, 1980).

No caso da inibição de síntese de DNA de células V79/M8 tratadas com Metilol-Violaceína (Fig. 8), observa-se um comportamento da captação de ^3H -Timidina por estas, mais lento e parcial. De acordo com Painter (1985), inibidores de iniciação de replicação e alongação de cadeia de DNA como os raios-X, e 4-nitroquinolina-N-óxido (Painter, 1978), bem como alguns inibidores de Topoisomerase II, são capazes de produzirem este tipo de comportamento. Logo isto poderia indicar que os derivados tóxicos de Violaceína estariam atuando ao nível de DNA em células V79/M8. Possivelmente, Violaceína e seus derivados não estariam atuando a este nível no protozoário. Entretanto, podem estar atuando em outra organela que não o núcleo celular.

Dos valores a seguir apresentados em forma de tabela, podemos salientar alguns dados importantes :

Droga	D ₃₇ [C] x 10 ⁵ M	ID ₅₀ [C] x 10 ⁵ M
Violaceína	1,545	13,36
Br-Violaceína	1,151	5,75
Metilol-Violaceína	3,00	nd

nd. não determinado na faixa de concentração utilizada.

1. o derivado sintético Bromo Violaceína mostrou-se mais tóxico, tanto ao nível sobrevivência celular, como ao nível de inibição de síntese de DNA.

2. o derivado sintético Metilol Violaceína mostrou-se menos tóxico para a linhagem celular V79/M8, tanto ao nível de sobrevivência celular, como ao nível de inibição de síntese de DNA. No entanto, mostra-se como sendo o derivado mais potente contra o flagelado *I. cruzi* (cepa Y) (Durán e col., 1987).

5.2. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE DE NIFURTIMOX E BENZNIDAZOLE.

Muitos nitrocompostos com atividade tripanocida têm sido descritos desde que Packchanian (1957), relatou a atividade de nitrofuranos contra a infecção experimental com *L. cruzi* (Brener, 1979). Como já foi citado na introdução deste trabalho, existem poucos compostos com atividade antitripanossomal com baixa toxicidade. Na atualidade só se conta com dois agentes quimioterápicos capazes de curar a doença durante sua fase aguda, são eles os nitroderivados Nifurtimox e Benznidazole, tendo em discussão ainda suas capacidades para produzirem curas verdadeiras na fase crônica (Moreno e col., 1982). Além disso, a resposta quimioterápica depende das cepas de *L. cruzi* utilizadas, pois existem cepas resistentes (Filardi e Brener, 1987).

A partir dos resultados de citotoxicidade de Violaceína e derivados, procuramos fazer um estudo comparativo da ação destes compostos e dos dois medicamentos mais usados clinicamente no Brasil e América Latina contra a Doença de Chagas, Nifurtimox e Benznidazole (Brener e Cançado, 1979 ; Gorla e col., 1989).

Na figura 5, observa-se que tanto Nifurtimox quanto Benznidazole, não se mostraram tóxicos para as células V79/MB, tratadas nas mesmas condições experimentais e de concentração dos experimentos com Violaceína e derivados (Fig. 4).

Estas duas drogas antichagásicas também foram testadas ao nível molecular, onde na figura 12 observa-se que nas mesmas condições de concentração usadas para Violaceína e derivados, o máximo de inibição da síntese de DNA dose dependente encontrado foi de 15 % para Benznidazole, e de 20 % para Nifurtimox.

Dados de literatura, entretanto, nos mostram que alguns nitrofuranos são mutagênicos em bactérias (Tazima e col., 1975), podendo também ser indutores de câncer em animais (Cohen e col., 1975), e de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos (Tonomura e Sasaki, 1973). Já com os derivados da família dos nitroimidazoles, sabe-se que estes compostos são carcinogênicos fracos (Rustia e Shubik, 1972) bem como mutagênicos (Voogd e col., 1979).

Alguns estudos têm mostrado que nitroimidazoles reduzidos eletroliticamente, ou através de agentes redutores bem como através da presença de um sistema de ativação microsomal (Fração S₉ de fígado de rato) (Ames e col., 1975), induzem quebras e desestabilização de cadeias, ocasionando o aparecimento de quebras simples no DNA (Knox e col., 1981). Estas quebras estão relacionadas com a produção de um grupo nitro, o qual ao ser reduzido, pode determinar a formação de um derivado nitroso instável e uma hidroxilamina, os quais são responsáveis por mutagênese, quebras simples de cadeia e alquilação de proteínas. (Docampo e col., 1981 a).

Estes dados da literatura podem então explicar os resultados obtidos por nós tanto ao nível de sobrevivência celular, quanto ao nível de inibição de síntese de DNA de células V79/M8 tratadas com Nifurtimox e Benznidazole (Fig. 5 e 12). A ausência da redução destas duas drogas, poderia impedir a ação tóxica destas nas concentrações testadas.

Não foi possível obtermos valores de ID_{50} para estes compostos. O efeito máximo de inibição de síntese de DNA de 20 % com ambas as drogas, provavelmente tenha sido devido à concentração limitante das drogas usadas nos experimentos. Este fato vem concordar com os resultados obtidos por DVorak e Howe (1977), onde comprovaram que na concentração de 10^{-4} M, Nifurtimox é capaz de arredondar as células do hospedeiro vertebrado de Iacuzzi, e descolá-las da garrafa de cultura.

5.3. ESTUDOS DA CINÉTICA DE RECUPERAÇÃO DE SÍNTESE DE DNA DE CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM VIOLACEÍNA E BROMO-VIOLACEÍNA.

Estudos recentes, apontam dois tipos de inibição de síntese de DNA produzida por vários agentes químicos ou físicos (Suciu, 1990). A inibição da síntese de DNA por agentes capazes de inativarem a iniciação dos replicons (Painter, 1978, 1986 Grupta e col., 1987 ; Woynarowski e col., 1988 ; Pommier e col., 1984), é um processo lento, onde os inibidores usados em baixas

doses, são capazes de reduzirem a replicação do DNA em apenas 50% dos valores dos controles. Ao contrário, a inibição da síntese de DNA por agentes capazes de inibirem a formação e/ou polimerização de deoxirribonucleotídeos (Collins e col., 1982 ; Muller e col., 1975), é um processo rápido, onde as concentrações dos inibidores usados, são capazes de reduzirem a replicação do DNA em valores superiores a 85 % em relação aos controles (Suciu, 1990).

Os nossos resultados dos estudos de cinética da recuperação da síntese de DNA de células V79/M8 tratadas com Violaceína e Bromo-Violaceína (Fig. 13 e 14), indicam uma não recuperação da síntese aos níveis normais após 6 horas da eliminação dos agentes testados (Painter, 1977). Este fato pode indicar a presença de um grande número de lesões presentes na molécula de DNA, as quais não são reparadas durante este intervalo de tempo.

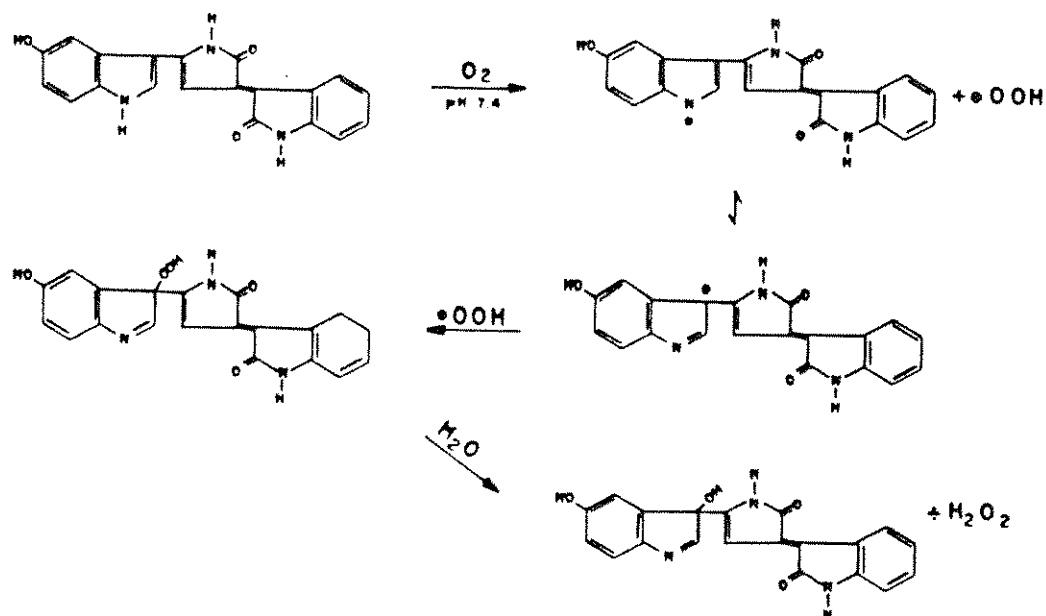
Na análise destes resultados, devemos considerar o fato de que a inibição da replicação do DNA produzida por inibidores da formação e/ou polimerização de deoxirribonucleotídeos é sempre revertida imediatamente após a eliminação dos agentes. Por outro lado, os efeitos causados por inibidores de iniciação de replicons e alongamento da cadeia de DNA, são irreversíveis.

No caso das células V79/M8 tratadas com Violaceína, observa-se uma pequena recuperação da replicação do DNA (Fig. 13). Este resultado pode ser devido ao fato de que, em doses

baixas os inibidores de iniciação de replicons, podem produzir uma pequena recuperação da replicação do DNA, a qual pode ser observada após 3 a 4 horas de retirada dos agentes (Suciu, 1990).

5.4. ESTUDOS DE PROTEÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE EM CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM VIOLACEÍNA NA PRESENÇA DE CATALASE.

Iniciamos este estudo na tentativa de elucidarmos um provável mecanismo de ação de Violaceína e de seus derivados sintéticos. Tentamos verificar um envolvimento dos intermediários reativos de oxigênio tanto na redução da fração de sobrevivência, quanto ao nível de inibição de síntese de DNA, de células V79/M8 tratadas com este agente. (Fig. 15 e 16). A proteção conferida pela catalase, mostra o papel do H_2O_2 em tais eventos. Estes resultados sugerem que Violaceína poderia estar formando H_2O_2 através de um mecanismo de peroxidação do anel imidazol com posterior hidrólise, levando à formação de H_2O_2 (Plieninger e col., 1955 ; Nakagawa e col., 1976). Um possível mecanismo poderia ser proposto :



Assim poderíamos explicar as diferenças encontradas nos valores de citotoxicidade e inibição de síntese de DNA para os três compostos, devido as propriedades que conferem os substituintes Bromo e Metilol (CH_2OH) à Violaceína. Estes substituintes podem favorecer ou impedir a formação do radical para posterior reação com o O_2 .

A ordem da possível peroxidação no anel imidazólico dos compostos utilizados seria :

Br-violaceína >> Violaceína >>> Metilol-Violaceína

A elucidação destas questões trará certamente contribuições importantes para o conhecimento do mecanismo de ação tanto de Violaceína, quanto de seus derivados sintéticos. Estes conhecimentos terão importância para a área médica já que, Violaceína se mostrou tóxica tanto para o crescimento, quanto para a motilidade de *L. cruzi*.

6. CONCLUSÕES.

1. Violaceína e Bromo-Violaceína se mostraram altamente tóxicas para a linhagem celular V79/M8.

2. O derivado sintético menos tóxico de Violaceína é o Metilol-Violaceína. O fato deste composto ser solúvel em água, ser o derivado menos tóxico para a linhagem celular V79/M8, e continuar sendo o mais efetivo contra o flagelado *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen), poderia representar uma boa possibilidade como uma droga opcional para o tratamento da enfermidade de Chagas.

3. A síntese de DNA de células V79/M8, tratadas tanto com Violaceína, quanto com Bromo-Violaceína, não se recupera durante um intervalo de 6 horas pós tratamento.

4. A enzima antioxidante, Catalase, minimiza o efeito tóxico de Violaceína, tanto ao nível de sobrevivência celular, quanto ao nível de inibição de síntese de DNA em células V79/M8. Podendo haver um possível envolvimento de H_2O_2 no mecanismo de ação.

5. Os nitrocompostos, Benznidazole e Nifurtimox, não foram tóxicos para a linhagem celular V79/M8, tanto ao nível de sobrevivência, quanto ao nível de inibição de síntese de DNA nas concentrações testadas.

6. Um estudo detalhado do mecanismo de ação é eminente e necessário para elucidar as diferenças encontradas nos resultados com Violaceína, Bromo-Violaceína e Metilol-Violaceína.

7. SUMÁRIO

A Doença de Chagas é uma infecção parasitária que afeta milhões de latino-americanos, causando nas áreas endêmicas, uma entre 10 mortes nos indivíduos de 25 a 64 anos de idade . A quimioterapia da doença é baseada principalmente no uso de dois medicamentos, Nifurtimox (Bay 2502 : Lampit) e Benznidazole (RO 7-1051 ; Radanil, Rochagan). Ambas as drogas possuem atividade genotóxica comprovada tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

Assim sendo, resolvemos investigar os efeitos citotóxicos do pigmento biossintético de *Chromobacterium violaceum* (Cepa BB-78), o 1,3-dihidro-2H-indol-2 ona, comumente denominado como Violaceína, bem como de seus derivados, Bromo-Violaceína e Metilol-Violaceína, já que este composto apresentou um perfil biológico interessante, mostrando-se com baixo poder hemolítico, ação microbiana e o mais importante, atividade tripanocida *in vitro*. Entretanto, Violaceína exibiu uma alta toxicidade para células V79/M8, assim como Bromo-Violaceína. Já o derivado Metilol-Violaceína exibiu uma citotoxicidade baixa em relação aos outros 2 compostos.

A atividade citotóxica de Nifurtimox e Benznidazole também foi testada em células V79/M8. Entretanto, estes 2 compostos se comportaram de maneira similar ao Metilol-Violaceína, tanto na sobrevivência celular, quanto para a inibição da síntese de DNA.

Sabe-se no entanto, que os efeitos tóxicos dos medicamentos são devidos à sua biotransformação nitrorredutiva para radicais que possam reagir com constituintes celulares, causando efeitos deletérios.

Dosagens preliminares realizadas durante o tratamento das células com Violaceína, indicaram a presença de H_2O_2 no meio reacional, apontando assim, para uma possibilidade de ser uma espécie responsável pelos efeitos cito e genotóxicos encontrados nestes estudos.

7. SUMMARY

Chagas'Disease is a parasitic infection that affects million of Latinamericans, inducing in endemic areas one in ten deaths in humans between 25 to 64 years old. Disease's chemotherapy is based on the use of two drugs, Nifurtimox (Bay 2502 : Lampit) and Benznidazole (R0 7-1051 ; Radanil : Rochagan). Both drugs have a confirmed genotoxic activities in vitro and in vivo.

We decided to test the cytotoxic effects of the biosynthetic pigment of *Chromobacterium violaceum* (strain BB-78), usually known as Violacein, as well as its derivatives, Br-Violacein and Methyl-Violacein. This last compound has interesting biological profiles as low hemolytic effect, microbian action and principally in vivo trypanocide activity. Violacein and Br-Violacein exhibited a high toxicity in V79/M8 cells. The Methhyl-Violacein derivative showed a low cytotoxicity compared to the other two compounds.

Nifurtimox and Benznidazole cytotoxic activity was also tested in V79/M8 cells. However, the profile of both was similar to Methyl-Violacein in cellular survival and DNA inhibition synthesis experiments.

It is known that the toxic effects of those drugs are due to their nitroreductive biotransformation to reactive free radicals, interacting with cellular constituents causing the deleterious effects.

On preliminary studies using the incubation medium of Violacein treatments in V79/M8 cells we observed H_2O_2 formation, a reactive species that may be responsible for the detected cyto and genotoxic effects.

B.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames,B.N.; McCann,J. and Yamasaki,E. (1975). Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenecity test. *Mutation Res.* 31, 347-364.
- Ballantine,J.; Barret,C.; Beer,R.; Boggians,B.; Clark,K.;Eardley,B.; Jennings,B. and Robertson,A. (1957). *J. Chem. Soc.* 2222 .
- Boainnaim,E. (1979). Tratamiento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. *Rev. Goiana Med.* 25, 1-60 .
- Boisbaudran,L. (1882). Matière colorante se formant dans la colle da farine. *Compt. Rend.* 94, 562 .
- Boveris,A. and Stoppani,A.O.M. (1977). Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 33, 1306-1308 .
- Boveris,A.; Sies,H.; Martino,E.E.; Docampo,R.; Turrens,J.F. and Stoppani,A.O.M. (1980). Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 188, 643-648.
- Brener,Z. (1979). Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the western hemisphere. *Pharmacol. Ther.* 7, 71-90 .

Brener, Z. and Cançado, J.R. (1979). Terapêutica. In : Brener, Z. and Andrade, Z.A. eds. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan p.362-424 .

Burbank, W.D. (1942). Physiology of the ciliate *Colepodium coleoda*. I. The effect of various bacteria as food on the division rate of *Colepodium coleoda*. *Physiol. Zool.* 15, 342 .

Caldas, L.R. (1977). Photochemistry and Photobiology in virgin lands. *Photochem. Photobiol.* 26, 1-2 .

Caldas, L.R.; Leitão, A.A.C.; Santos, S.M. and Tyrrel, R.M. (1978). Preliminary experiments on the photobiological properties of Violacein. *Inter. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol.*, 121-126

Campos, V.; Erazo, S. and Durán, N. (1982). Novos fotoprodutos com atividade antimicrobiana de *Chromobacterium violaceum*. *Arq. Biol. tecnol.* 25, 147 .

Cançado, J.R.; Salgado, A.A.; dos Santos, J.F.C.; Batista, S.M. and Chiari, C. (1976). Clinical trials in Chagas disease. In : *American Trypanosomiasis Research*. Scientific Publication n.318 p. 266-271. Pan American Health Organization. Washington, D.C. .

Carpintero, J.D. (1983). Uso del ácido tióctico para la prevención de los efectos secundarios provocados por el Benznidazol en pacientes con infección de Chagas crónica. *Medicina* 43, 285-290 .

Cleveland,R.L. (1925). Woods Hole Mass. Biol. Bull. 48, 309 .

Cohen,M.S.; Erturk,E.; Van Esch,M.A.; Crovetti,J.A. and Bryan,G. T. (1975). Carcinogenicity of 5-nitrofurans and related compounds with amino-heterocyclic substituents. J. Natl. Cancer Inst. 54, 841-850 .

Collins,A.R.S.; Squires,S. and Johnson,R.T. (1982). Inhibitors of repair DNA synthesis. Nucl. Acids Res. 10, 1203-1213 .

Corpe,W.A. (1951). A study of the wide spread distribution of *Chromobacterium* species in soil by a simple technique. J. Bacteriol. 62, 515 .

De Castro,S.L.; Soeiro,M.N.C. and Meirelles,M.M.L. (1986). Effect of drugs on amastigotes and trypomastigotes of *L. cruzi* and on the interaction of heart muscle cell with bloodstream trypomastigotes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81, 154 .

De Moss,R.D. and Evans,N.R. (1959). Physical aspects of Violacein biosynthesis in non-proliferating cells. J. Bacteriol. 78, 583-588 .

De Moss,R.D. (1967). Violacein. Antibiotics 2, 77-81 .

Dias,P.J.C. (1984). Enfermedad de Chagas. Epidemiologia Clinica Terapeutica,10-84. Programa de Salud Humana, Buenos Aires

Docampo, R. and Stoppani, A.O.M. (1979). Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by Nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. Arch. Biochem. Biophys. 197, 317-321 .

Docampo, R. (1980). Generation of free radicals from Nifurtimox in *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. In: Van den Bossche, H. ed.. The Host-Invader Interplay. Amsterdam, Elsevier, 677-681 .

Docampo, R. and Stoppani, A.O.M. (1980). Sobre el mecanismo de la acción tripanocida del Nifurtimox y otros nitroderivados en *Trypanosoma cruzi*. Medicina 50(1), 10-15 .

Docampo, R.; Mason, R.P.; Mottley, C. and Muñiz, R.P. (1981 a). Generation of free radicals induced by Nifurtimox in mammalian tissues. J. Biol. Chem. 256, 10930-10933 .

Docampo, R.; Moreno, S.N.J. and Stoppani, A.O.M. (1981 b). Nitrofurant enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 207, 316-324 .

Docampo, R. and Moreno, S. (1984). Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. Rev. Infect. Dis. 6, 223-238 .

Docampo, R. and Moreno, S.N.J. (1985). Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and

chemoprophylaxis of American trypanosomiasis. In : Reviews in Biochemical Toxicology. Hodgson, E.; Bend, J.R.; Philpot, R.M. eds.. New York, Elsevier Science Publishing Co. p. 159-204 .

Docampo, R. and Moreno, S.N.J. (1986). in Free Radicals in Biology. W.A. Pryor, ed.. Academic Press, New York. pp 243-288 .

Durán, N. and Faljoni-Alario, A. (1978). Química de bacterias: Estudio fotoquímico de *Chromobacterium violaceum*. Cienc. e Cult. 30, 609 .

Durán, N. and Faljoni-Alario, A. (1980) . Bacterial chemistry of a potential phototherapeutic substance from *C. violaceum*. An. Acad. Brasil. Cienc. 52, 297-302.

Durán, N.; Erazo, S. and Campos, V. (1983). Bacterial chemistry II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. An. Acad. Brasil. Cienc. 55, 231-234 .

Durán, N. (1989). A bioprocess and synthesis of antimicrobial and trypanocide products from *Chromobacterium violaceum* (Brazilian strain) US. Patent Submitted.

Durán, N.; Campos, V.; Riveros, R.; Joyas, A.; Erazo, S. and Haun, M. (1989). Bacterial chemistry III: preliminary studies on tripanocide activities of *Chromobacterium violaceum* products. An. Acad. Brasil. Cienc. 36 , 31-36.

Dvorak, J.A. and Howe, C.L. (1977). The effects of Lampit (Bayer 2502) on the interaction of *Trypanosoma cruzi* with vertebrate cells in vitro. The Amer. J. Trop. Med. Hyg. 26, 58-63 .

Ebringer, L. and Bencova, M. (1980). Mutagenicity of nitrofurantoin drugs in bacterial systems. Folia Microbiologica 25, 388-396 .

Fairlamb, A.H. and Cerami, A. (1985). Mol. Biochem. Parasitol. 14, 187-198.

Fairlamb, A.H. ; Blackburn, P. ; Ulrich, P. ; Chait, B.T. and Cerami, A. (1985). Science 227, 1485-1487.

Ferreira, R.C.C. and Ferreira, L.C.S. (1986 a). Avaliação do potencial mutagênico - carcinogênico de fármacos pelo ensaio Salmonella/fracção microsossomal. I. Mutagenicidade de drogas anti *T. cruzi*. Cienc. Cult. 38, 696-702 .

Ferreira, R.C.C. and Ferreira, L.C.S. (1986 b). Mutagenicity of Nifurtimox and Benznidazole in the Salmonella microsome assay. Brazilian J. Med. Biol. Res. 19, 19-25 .

Filardi, A.H. and Brener, Z. (1982). A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Ann. Trop. Med. Parasitol. 76, 293-297 .

Filardi,A.H. and Brener,Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of a *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81, 755-759 .

Ford,P. and Yerganian,A. (1958). Observations on the chromossomes of chinese hamster cells in tissue culture. J. Natl. Cancer Inst. 21, 393-425 .

Fridovich,I. (1976). Oxygen radicals,hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In: Pryor,W.A.,ed. Free Radical in Biology.New York, Academic V. 1,p. 239-277 .

Fridovich,I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 239-257 .

Friedberg,E.C. (1985). DNA Repair.New York,Freeman,p.54-59 .

Gilman,J. (1953). Studies on certain species of bacteria assigned to the genus Chromobacterium. J. Bacteriol. 65, 48-52 .

Gorla,N.B. and Castro,A.J. (1985). Micronucleus formation in bone marrow of mice treated with Nifurtimox or Benznidazole. Toxicol. Lett. 25, 259-263 .

Gorla,N.B.; Diaz Gomes,I.M. and Castro,A.J. (1986). Interaction of Benznidazole with DNA and nuclear proteins from rat liver.

Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 280, 22-31 .

Gorla, N.B. (1987). Sister chromatid exchange in splenic lymphocytes of mice after exposure to Nifurtimox or Benznidazole. Mutation Res. 188, 129-133 .

Gorla, N.B.; Ledesma, S.O.; Barbieri, P.G. and Larripa, B.I. (1988). Assesment of cytogenetic damage in chagasic children treated with Benznidazole. Mutation Res. 206, 217-220 .

Gorla, N.B.; Ledesma, S.O.; Barbieri, P.G. and Larripa, B.I. (1989) Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with Nifurtimox. Mutation Res. 224, 263-267 .

Grupta, R.S.; Bromke, A.; Bryant, D.W.; Grupta, B.; Singh, B. and McCalla, D.R. (1987). Etoposide (VP 16) and terriposide (VM 26) : novel anticancer drugs strongly mutagenic in mammalian but not prokaryotic test systems. Mutagenesis 2, 179-186 .

Gutteridge, W.E.; Ross, J.; Hargadon, M.R.J and Hudson, J.E. (1982). *Crithidia fasciculata* : a catalase-containing trypanosomatid sensitive to nitroheterocyclic drugs. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. 76(4), 493-496 .

Haberkorn, A. and Gonnert, R. (1972). Animal experimental investigation into the activity of Nifurtimox against *Trypanosoma*

cuzi. *Arzneim-Forsch* 22(9a), 1570-1582 .

Hall, J.D. and Mount, D.W. (1981). Mechanisms of DNA replication and mutagenesis in ultraviolet irradiated bacteria and mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 25, 53-126 .

Hartley, W. (1913). On a violet colouring-matter and its production by a certain bacterium. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.* 144, 63 .

Haun, M.; Pereira, M.F.; Hoffmann, M.E.; Joyas, A. ; Campos, V.; Filardi, L.D.S.; De Castro, S. and Durán, N.. *Bacterial Chemistry VI: Biological activities and citotoxicity of 1,3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives*. Submitted Artivos de Biologia, Medicina Experimentales. Santiago-Chile. (Novembro de 1990).

Henderson, G.B.; Ulrich, P.; Fairlamb, A.H.; Rosenberg, I.; Pereira, M.; Sela, M. and Cerami, A. (1988). Suversive substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5374-5378 .

Kidder, G.M. and Stuart, C.A. (1939). Growth studies on ciliates. I. The role of bacteria in the growth and reproduction of colpoda. *Physiol. Zool.* 12, 329 .

Knight,R.C.; Skolimowski,I.M. and Edwards,D.I. (1978). The interaction of reduced metronidazole with DNA. Biochem. Pharmacol. 27, 2089-2093 .

Knox,R.J.; Knight,R.C. and Edwards,D.I. (1981). Misonidazole-induced thymidine release from DNA. Biochem. Pharmacol. 30, 1925-1929 .

Laplumé,H.; Barosse,P.A. and Cabrera,H. (1985). Efectos indeseables de Nifurtimox y Benznidazol. Medicina 82, 42-55.

Lasseur,PH. and Girardet,R. (1926). Contribution a l'étude des pigments microbiens. Bull. Trimestriel Soc. Sci. Nancy,3 (Series 4), 1-77 .

Lehninger,A.L. (1982). In Principles of Biochemistry. Worth Publishers,INC. New York, N.Y..

Letendre,C.; Dickens,G. and Guroff,J. (1974). The tryptophan hydroxylase of *Chromobacterium violaceum*. J. Biol. Chem. 249 (22) 7186. .

Lichstein,H.C. and van de Sand,V.F. (1945). Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. J. Infectious Diseases 76 (1) 47-51.

Masana,M.; Toranzo,D.G.E. and Castro,A.J. (1984). Reductive metabolism and activation of Benznidazole. Biochem. Pharmacol. 33(7), 1041-1045 .

McCalla,D.R. (1983). Mutagenecity of nitrofurán derivatives. Environ. Mutagen. 5, 745-765 .

McLane,K.E.; Fisher,J. and Ramakrishnan,K. (1983). Reductive drug metabolism. Drug Metab. Rev. 14(4), 741-799 .

Mitoma,C.; Weissbach,H. and Udenfriend,S. (1955). Formation of 5-hydroxytryptophan from tryptophan by *Chromobacterium violaceum* Nature (London) 175 (4466), 994-995.

Moncaya,A. (1986). Research activities of the scientific working group (SWG) on Chagas disease.1982-1985,UDP/World Bank/Who. Special Program,Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81, 181-244 .

Moreno,S.N.J.; Docampo,R.; Mason,R.P.; Leon,W. and Stoppani,A.O. M. (1982). Different behaviors of Benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. Arch. Biochem. Biophys. 218(2), 585-591 .

Moreno,S.N.J. and Docampo,R. (1985). Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. Envirom. Health Perspec. 64, 199-208 .

Muel,B. and Santos,S.M. (1978). Physiochemical properties of Violacein. Inter. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol. 127-132 .

Muller,W.E.G.; Rhode,H.J.; Beyer,R.; Maidhof,A.; Lachmann,M.; Taschner,H. and Zahn,R.K. (1975). Mode of action of 9-B-D-arabinofuranosyladenine on the synthesis of DNA,RNA and protein in vitro and in vivo. Cancer Res. 35, 2160-2168 .

Nagel,R. (1987). Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. Mutation Res. 191, 17-20 .

Nagel,R. and Nepomnaschy,I. (1983). Mutagenecity of 2-anti-chagasic drugs and their metabolic deactivation. Mutation Res. 117, 237-242 .

Nakagawa,M. ; Okajima,H. and Hino,T. (1976). J. Amer. Chem. Sr. 98, 635-637.

Nakazawa,H.; Enei,H.; Okurmura,S. Yashida,H. and Yamada,H.(1972). FEBS. Lett. 25, 43-47 .

Olive,P.L. (1979). Inhibition of DNA synthesis by nitroheterocycles. II. Mechanisms of cytotoxicity. Br. J. Cancer 40, 94-104 .

Packchanian,A. (1957). Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurantoin compounds. Antibiot. Chemother. 7(1),

13-23 .

Painter,R.B. (1977). Rapid test to detect agents that damage human DNA. Nature (London) 265, 650-651 .

Painter,R.B. (1978). Inhibition of DNA replicon initiation by 4-nitroquinoline 1-oxide, adriamycin and ethyleneimine. Cancer Res. 38, 4445-4449 .

Painter,R.B. and Young,B.R. (1980). Radiosensitivity in ataxia telangiectasia: a new explanation. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 7315-7317 .

Painter,R.B. and Howard,R. (1982). The Hela DNA synthesis inhibition test as a rapid screen for mutagenic carcinogens. Mutation Res. 92, 427-437 .

Painter,R.B. (1985). Inhibition of mammalian DNA synthesis by ionizing radiation. Int. J. Radiat. Biol. 49, 771-781 .

Peterson,F.J.; Maosn,R.P.; Hovsepian,J. and Hottzman,J.L. (1979). Oxygen sensitive and insensitive nitroreduction by *E. coli* and rat hepatic microsomes. J. Biol. Chem. 254, 4009-4014 .

Plieninger, H. ; Sueheiro,T. ; Suhr,K. and Decker,M. (1955). Chem. Ber. 88, 370.

Pommier,Y.; Scharfs,R.E.; Kohn,W.K. and Zwelling,L.A. (1984). Formation and rejoining of deoxyribonucleic acid double strand breaks induced in isolated cell nuclei by antineoplastic intercalating agents. *Biochemistry* 23, 3194-3201 .

Reilly,J. and Pyne,G. (1927). On the pigment produced by *Chromobacterium violaceum* . *Biochem. J.* 21, 1059 .

Riveros,R.; Campos,V.; Joyas,A.; Erazo,S. and Durán,N. (1985). Bacterial chemistry : studies on trypanosomal activities of 1,3-hydro-2H-indol-3-one derivatives. *Arq. Biol. Tecnol.* 28, 61 .

Riveros,R.; Haun,M.; Campos,V. and Durán,N. (1987). Bacterial chemistry IV: Total characterization of Violacein. An antibiotic and trypanocide from *Chromobacterium violaceum*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* .

Rowley,D.A.; Knight,R.C.; Skolimowski,M.I. and Edwards,D.I. (1980). The relationship between misonidazole cytotoxicity and base composition of DNA. *Biochem. Pharmacol.* 29, 2095-2098 .

Rustia,M. and Shubik,P. (1972). Induction of lung tumor and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J. Natl. Cancer Inst.* 48, 721-729 .

Sartory,A.; Meyer,J. and Wealdele,J. (1983). Contribution à l'étude d'une violacéine obtenue à l'état cristallisé et provenant

d' un bacille violet isolé du pus d'un abcès dentaire. Compt. Rend. Soc. Biol. 206, 950 .

Sebek, O.K. and Jager, H. (1962). Divergent pathways of indole metabolism in *Chromobacterium violaceum*. Nature (London) 196, 793-795 .

Shames, L.S.; Fairlamb, H.A.; Cerami, A. and Walsh, T.C. (1986). Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. Biochemistry 25, 3519-3526 .

Silva, O.A.; Silva, A.A. and Malta, J.A. (1986). Etiologic treatment of chronic Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81, 153 .

Sims, P. and Gutteridge, W.E. (1978). Inhibitory action of a 5-nitrofurans (SQ 18506) against nucleic acid synthesis in *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Pharmacol. 27, 2815-2820 .

Spanó, M.A. and Takahashi, C.S. (1981). Genetic effects of Nifurtimox on *Drosophila melanogaster*, Wistar rats and *Allium cepa*. Brazilian J. Genetics 3, 357-366 .

Stratford, I.J.; O'Neill, P.; Sheldon, P.W.; Silver, A.R.J.; Walling, J.M. and Adams, G.E. (1986). RSU 1069, a nitroimidazole containing an aziridine group. Bioreduction greatly increases cytotoxicity

4.4. ESTUDOS DE PROTEÇÃO DO EFEITO LETAL NA VIABILIDADE CELULAR E NA INIBIÇÃO DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/M8 EXPOSTAS À VIOLACEÍNA.

Neste estudo procuramos verificar a ação de Violaceína na presença de Catalase, uma enzima antioxidante (Lehninger, 1985). Esta enzima é frequentemente utilizada nos estudos moleculares de vários agentes, com o objetivo de investigar a formação e a participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos efeitos deletérios observados.

A figura 15 mostra o efeito de proteção conferido pela Catalase frente ao efeito tóxico de Violaceína para a sobrevivência celular. Observou-se um D_{37} de $3,0 \times 10^{-5}$ M.

Com a finalidade de verificarmos uma provável participação do peróxido de hidrogênio na inibição da síntese de DNA produzida por Violaceína, realizamos os estudos de proteção com Catalase. A figura 16 nos mostra um ID_{50} de 16×10^{-5} M para células V79/M8 tratadas com Violaceína na presença de Catalase.

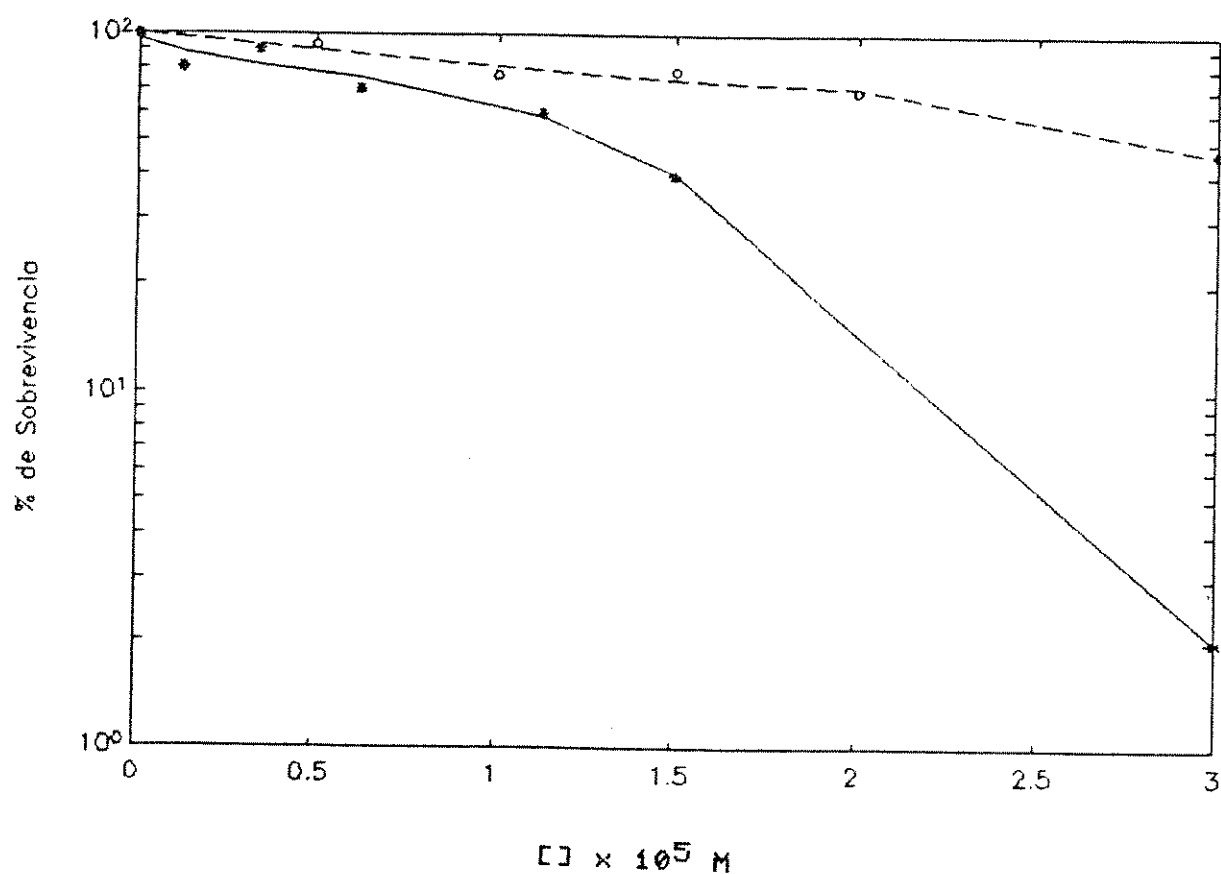


FIGURA 15 : CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM VIOLACEÍNA NA PRESENÇA DE CATALASE.

As células (300 células/placa de 5,0 cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de Violaceína (*), e Violaceína na presença de Catalase (250 U/ml) (o) por 30 minutos a 37°C e as colônias formadas contadas após 7 dias de crescimento como descrito em Material e Métodos (item 3.5).

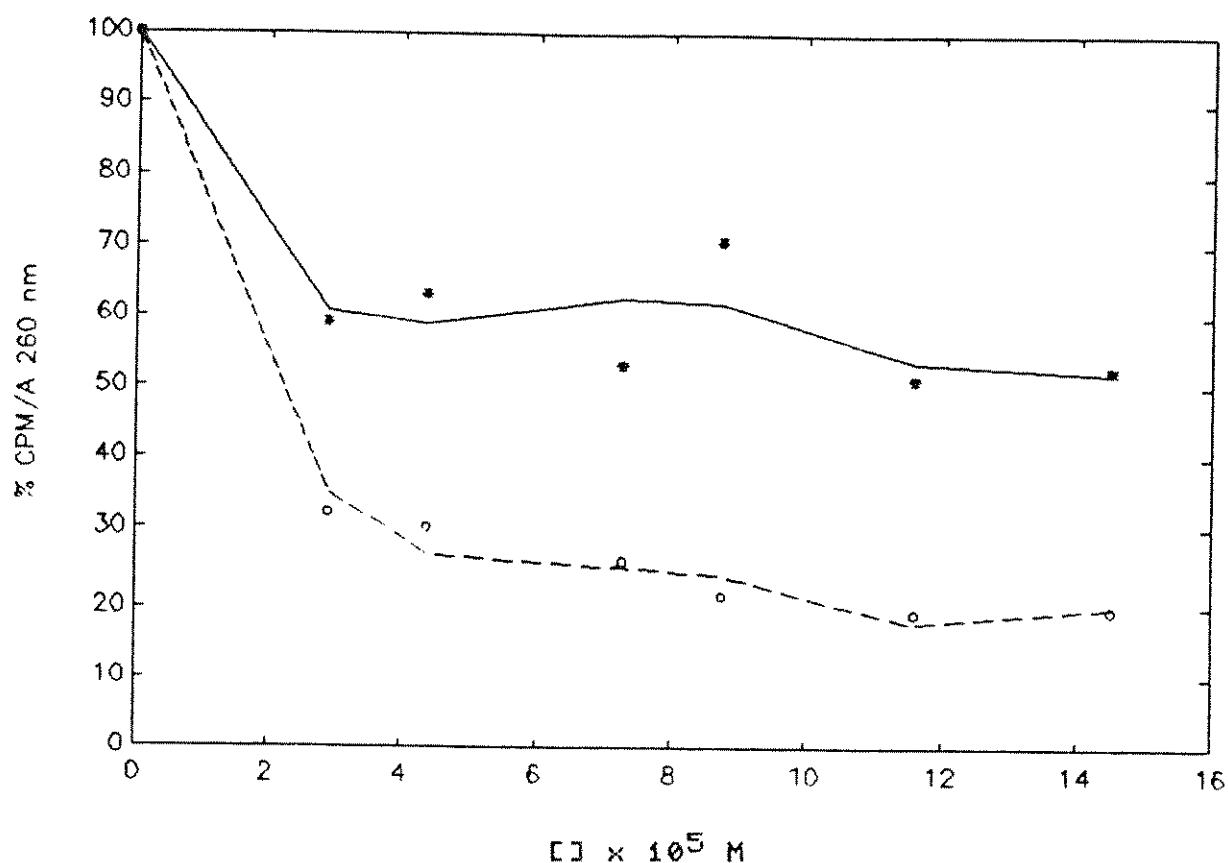


FIGURA 16 : TAXA DE SÍNTESE DE DNA EM CÉLULAS V79/MB TRATADAS COM VIOLACEÍNA NA PRESENÇA DE CATALASE.

Células em crescimento exponencial (10.000 / placa) foram tratadas com diferentes concentrações de Violaceína (o) e Violaceína na presença de Catalase (*) (250 U/ml) por 30 minutos a 37°C e posteriormente incubadas em meio de cultura contendo ³H-timidina (10 uCi/ml) por um período de 30 minutos. A quantidade de ³H-timidina incorporada no material celular ácido insolúvel foi utilizada como atividade de síntese de DNA (item 3.6). A razão entre a radioatividade e absorbância de cada amostra foi tomada como expressão da síntese de DNA (cpm/A₂₆₀ nm). Os dados foram expressos em porcentagem relativa à síntese do controles (100 %), os quais foram expostos somente ao tampão.

5.DISSCUSSÃO

5.1. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE DE VIOLACEÍNA E DERIVADOS.

Neste trabalho, o ponto de partida foi estudarmos os efeitos de Violaceína sobre os processos de viabilidade celular e replicação do DNA na linhagem celular V79/M8.

Este interesse nasceu após verificar-se em nossos laboratórios, que a Violaceína na faixa de dose de 10 a 40 ug/ml, inibia o crescimento do flagelado *L. cruzi* (Durán e col., 1987). Sendo assim, nosso objetivo consistiu em avaliar os efeitos citotóxicos deste composto com ação tripanocida comprovada, na tentativa de encontrarmos um agente potencial para o tratamento da enfermidade de Chagas.

Como apresentado na figura 1, a Violaceína se mostrou altamente tóxica para as células V79/M8. Este resultado nos levou a testar dois derivados sintéticos deste composto : Bromo-Violaceína e Metilol-Violaceína. Estes testes foram feitos na tentativa de encontrarmos um derivado menos tóxico para as células, que fosse solúvel em água e que tivesse ação inibitória, tanto na motilidade do *L. cruzi*, quanto no seu crescimento (Haun e col., 1990).

Os resultados por nós obtidos entretanto, nos mostraram que Br-Violaceína apresenta um D₃₇ semelhante ao apresentado por Violaceína. (Fig. 4). Entretanto, em testes realizados em nossos laboratórios, Violaceína após 80 horas de cultura de *I. cruzi* (forma epimastigota, cepa Tulahuen) inibiu 70 % da motilidade do flagelado, enquanto Bromo Violaceína inibe ao final do mesmo tempo, apenas 50 % .

Já as células V79/M8 tratadas com Metilol-Violaceína nas mesmas concentrações usadas para Violaceína e Br-Violaceína, se mostraram mais resistentes aos efeitos letais deste derivado, apresentando um D₃₇ de $3,0 \times 10^{-5}$ M. (Fig. 3). No entanto, este composto se mostra como o mais efetivo tanto na inibição de crescimento do flagelado como da motilidade. Metilol Violaceína ao final de 48 horas inibe 100 % a motilidade do flagelado (Tabelas 1 e 2 pag. 11).

Podemos notar que a ação de imobilização do flagelo, bem como de mortalidade do *I. cruzi* não estão relacionados com o efeito tóxico de Violaceína e seus derivados em células V79/M8, já que o Metilol Violaceína, composto menos tóxico é o mais efetivo contra as formas epimastigotas deste protozoário.

Após os experimentos de sobrevivência celular para detectarmos o efeito de Violaceína e seus derivados sintéticos na viabilidade reprodutiva de células V79/M8, procuramos verificar se esses agentes seriam capazes de produzir algum efeito ao nível

molecular, como por exemplo, inibição da síntese de DNA.

A inibição do processo de replicação do DNA consiste numa resposta celular genérica e imediata à presença de lesões nessa molécula, induzidas por agentes químicos ou físicos (Painter, 1977).

Na figura 9, pode-se observar que Violaceína e seus derivados usados na mesma faixa de concentração, inibiram a síntese de DNA de uma forma dose dependente, sendo que Bromo-Violaceína foi o maior inibidor, apresentando um ID_{50} de $5,75 \times 10^{-5}$ M.

A inibição da síntese semiconservativa do DNA em células eucarióticas, pode resultar de diferentes tipos de perturbações no processo de replicação (Hall e Mount, 1981). Ela pode ser causada por um bloqueio da iniciação das unidades de replicação, os replicons, pelo bloqueio da progressão dos pontos de crescimento do DNA já existentes, e pela redução da velocidade de deslocamento da "forquilha de replicação" (Painter e Howard, 1982). Incluem também alterações das enzimas envolvidas no próprio processo de síntese (Friedberg, 1985).

Assim, através das figuras 6 e 7 observa-se um comportamento bifásico da inibição da síntese de DNA por Violaceína e Bromo-Violaceína. Essa resposta bifásica observada mostra um efeito intenso em doses baixas, ocasionado pelo

bloqueio da iniciação de replicons, e um aumento pequeno da inibição em doses mais elevadas ocasionado pelo impedimento do progresso da forquilha de replicação. Este fato assemelha-se ao obtido com células eucarióticas tratadas com radiação ionizante (Painter e Young, 1980).

No caso da inibição de síntese de DNA de células V79/M8 tratadas com Metilol-Violaceína (Fig. 8), observa-se um comportamento da captação de ^3H -Timidina por estas, mais lento e parcial. De acordo com Painter (1985), inibidores de iniciação de replicação e alongação de cadeia de DNA como os raios-X, e 4-nitroquinolina-N-óxido (Painter, 1978), bem como alguns inibidores de Topoisomerase II, são capazes de produzirem este tipo de comportamento. Logo isto poderia indicar que os derivados tóxicos de Violaceína estariam atuando ao nível de DNA em células V79/M8. Possivelmente, Violaceína e seus derivados não estariam atuando a este nível no protozoário. Entretanto, podem estar atuando em outra organela que não o núcleo celular.

Dos valores a seguir apresentados em forma de tabela, podemos salientar alguns dados importantes :

Droga	D ₃₇ [C] x 10 ⁵ M	ID ₅₀ [C] x 10 ⁵ M
Violaceína	1,545	13,36
Br-Violaceína	1,151	5,75
Metilol-Violaceína	3,00	nd

nd. não determinado na faixa de concentração utilizada.

1. o derivado sintético Bromo Violaceína mostrou-se mais tóxico, tanto ao nível sobrevivência celular, como ao nível de inibição de síntese de DNA.

2. o derivado sintético Metilol Violaceína mostrou-se menos tóxico para a linhagem celular V79/M8, tanto ao nível de sobrevivência celular, como ao nível de inibição de síntese de DNA. No entanto, mostra-se como sendo o derivado mais potente contra o flagelado *I. cruzi* (cepa Y) (Durán e col., 1987).

5.2. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE DE NIFURTIMOX E BENZNIDAZOLE.

Muitos nitrocompostos com atividade tripanocida têm sido descritos desde que Packchanian (1957), relatou a atividade de nitrofuranos contra a infecção experimental com *L. cruzi* (Brener, 1979). Como já foi citado na introdução deste trabalho, existem poucos compostos com atividade antitripanossomal com baixa toxicidade. Na atualidade só se conta com dois agentes quimioterápicos capazes de curar a doença durante sua fase aguda, são eles os nitroderivados Nifurtimox e Benznidazole, tendo em discussão ainda suas capacidades para produzirem curas verdadeiras na fase crônica (Moreno e col., 1982). Além disso, a resposta quimioterápica depende das cepas de *L. cruzi* utilizadas, pois existem cepas resistentes (Filardi e Brener, 1987).

A partir dos resultados de citotoxicidade de Violaceína e derivados, procuramos fazer um estudo comparativo da ação destes compostos e dos dois medicamentos mais usados clinicamente no Brasil e América Latina contra a Doença de Chagas, Nifurtimox e Benznidazole (Brener e Cançado, 1979 ; Gorla e col., 1989).

Na figura 5, observa-se que tanto Nifurtimox quanto Benznidazole, não se mostraram tóxicos para as células V79/MB, tratadas nas mesmas condições experimentais e de concentração dos experimentos com Violaceína e derivados (Fig. 4).

Estas duas drogas antichagásicas também foram testadas ao nível molecular, onde na figura 12 observa-se que nas mesmas condições de concentração usadas para Violaceína e derivados, o máximo de inibição da síntese de DNA dose dependente encontrado foi de 15 % para Benznidazole, e de 20 % para Nifurtimox.

Dados de literatura, entretanto, nos mostram que alguns nitrofuranos são mutagênicos em bactérias (Tazima e col., 1975), podendo também ser indutores de câncer em animais (Cohen e col., 1975), e de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos (Tonomura e Sasaki, 1973). Já com os derivados da família dos nitroimidazoles, sabe-se que estes compostos são carcinogênicos fracos (Rustia e Shubik, 1972) bem como mutagênicos (Voogd e col., 1979).

Alguns estudos têm mostrado que nitroimidazoles reduzidos eletroliticamente, ou através de agentes redutores bem como através da presença de um sistema de ativação microsomal (Fração S₉ de fígado de rato) (Ames e col., 1975), induzem quebras e desestabilização de cadeias, ocasionando o aparecimento de quebras simples no DNA (Knox e col., 1981). Estas quebras estão relacionadas com a produção de um grupo nitro, o qual ao ser reduzido, pode determinar a formação de um derivado nitroso instável e uma hidroxilamina, os quais são responsáveis por mutagênese, quebras simples de cadeia e alquilação de proteínas. (Docampo e col., 1981 a).

Estes dados da literatura podem então explicar os resultados obtidos por nós tanto ao nível de sobrevivência celular, quanto ao nível de inibição de síntese de DNA de células V79/M8 tratadas com Nifurtimox e Benznidazole (Fig. 5 e 12). A ausência da redução destas duas drogas, poderia impedir a ação tóxica destas nas concentrações testadas.

Não foi possível obtermos valores de ID_{50} para estes compostos. O efeito máximo de inibição de síntese de DNA de 20 % com ambas as drogas, provavelmente tenha sido devido à concentração limitante das drogas usadas nos experimentos. Este fato vem concordar com os resultados obtidos por DVorak e Howe (1977), onde comprovaram que na concentração de 10^{-4} M, Nifurtimox é capaz de arredondar as células do hospedeiro vertebrado de Iacuzzi, e descolá-las da garrafa de cultura.

5.3. ESTUDOS DA CINÉTICA DE RECUPERAÇÃO DE SÍNTESE DE DNA DE CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM VIOLACEÍNA E BROMO-VIOLACEÍNA.

Estudos recentes, apontam dois tipos de inibição de síntese de DNA produzida por vários agentes químicos ou físicos (Suciu, 1990). A inibição da síntese de DNA por agentes capazes de inativarem a iniciação dos replicons (Painter, 1978, 1986 Grupta e col., 1987 ; Woynarowski e col., 1988 ; Pommier e col., 1984), é um processo lento, onde os inibidores usados em baixas

doses, são capazes de reduzirem a replicação do DNA em apenas 50% dos valores dos controles. Ao contrário, a inibição da síntese de DNA por agentes capazes de inibirem a formação e/ou polimerização de deoxirribonucleotídeos (Collins e col., 1982 ; Muller e col., 1975), é um processo rápido, onde as concentrações dos inibidores usados, são capazes de reduzirem a replicação do DNA em valores superiores a 85 % em relação aos controles (Suciu, 1990).

Os nossos resultados dos estudos de cinética da recuperação da síntese de DNA de células V79/M8 tratadas com Violaceína e Bromo-Violaceína (Fig. 13 e 14), indicam uma não recuperação da síntese aos níveis normais após 6 horas da eliminação dos agentes testados (Painter, 1977). Este fato pode indicar a presença de um grande número de lesões presentes na molécula de DNA, as quais não são reparadas durante este intervalo de tempo.

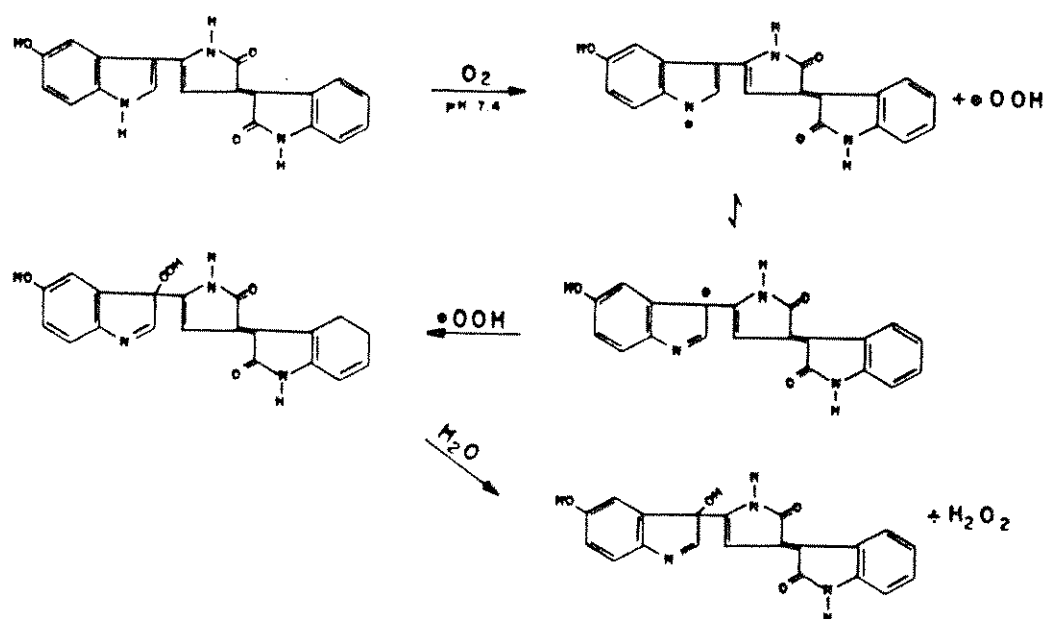
Na análise destes resultados, devemos considerar o fato de que a inibição da replicação do DNA produzida por inibidores da formação e/ou polimerização de deoxirribonucleotídeos é sempre revertida imediatamente após a eliminação dos agentes. Por outro lado, os efeitos causados por inibidores de iniciação de replicons e alongamento da cadeia de DNA, são irreversíveis.

No caso das células V79/M8 tratadas com Violaceína, observa-se uma pequena recuperação da replicação do DNA (Fig. 13). Este resultado pode ser devido ao fato de que, em doses

baixas os inibidores de iniciação de replicons, podem produzir uma pequena recuperação da replicação do DNA, a qual pode ser observada após 3 a 4 horas de retirada dos agentes (Suciu, 1990).

5.4. ESTUDOS DE PROTEÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE EM CÉLULAS V79/M8 TRATADAS COM VIOLACEÍNA NA PRESENÇA DE CATALASE.

Iniciamos este estudo na tentativa de elucidarmos um provável mecanismo de ação de Violaceína e de seus derivados sintéticos. Tentamos verificar um envolvimento dos intermediários reativos de oxigênio tanto na redução da fração de sobrevivência, quanto ao nível de inibição de síntese de DNA, de células V79/M8 tratadas com este agente. (Fig. 15 e 16). A proteção conferida pela catalase, mostra o papel do H_2O_2 em tais eventos. Estes resultados sugerem que Violaceína poderia estar formando H_2O_2 através de um mecanismo de peroxidação do anel imidazol com posterior hidrólise, levando à formação de H_2O_2 (Plieninger e col., 1955 ; Nakagawa e col., 1976). Um possível mecanismo poderia ser proposto :



Assim poderíamos explicar as diferenças encontradas nos valores de citotoxicidade e inibição de síntese de DNA para os três compostos, devido as propriedades que conferem os substituintes Bromo e Metilol (CH_2OH) à Violaceína. Estes substituintes podem favorecer ou impedir a formação do radical para posterior reação com o O_2 .

A ordem da possível peroxidação no anel imidazólico dos compostos utilizados seria :

Br-violaceína >> Violaceína >>> Metilol-Violaceína

A elucidação destas questões trará certamente contribuições importantes para o conhecimento do mecanismo de ação tanto de Violaceína, quanto de seus derivados sintéticos. Estes conhecimentos terão importância para a área médica já que, Violaceína se mostrou tóxica tanto para o crescimento, quanto para a motilidade de *I. cruzi*.

6. CONCLUSÕES.

1. Violaceína e Bromo-Violaceína se mostraram altamente tóxicas para a linhagem celular V79/M8.

2. O derivado sintético menos tóxico de Violaceína é o Metilol-Violaceína. O fato deste composto ser solúvel em água, ser o derivado menos tóxico para a linhagem celular V79/M8, e continuar sendo o mais efetivo contra o flagelado *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen), poderia representar uma boa possibilidade como uma droga opcional para o tratamento da enfermidade de Chagas.

3. A síntese de DNA de células V79/M8, tratadas tanto com Violaceína, quanto com Bromo-Violaceína, não se recupera durante um intervalo de 6 horas pós tratamento.

4. A enzima antioxidante, Catalase, minimiza o efeito tóxico de Violaceína, tanto ao nível de sobrevivência celular, quanto ao nível de inibição de síntese de DNA em células V79/M8. Podendo haver um possível envolvimento de H_2O_2 no mecanismo de ação.

5. Os nitrocompostos, Benznidazole e Nifurtimox, não foram tóxicos para a linhagem celular V79/M8, tanto ao nível de sobrevivência, quanto ao nível de inibição de síntese de DNA nas concentrações testadas.

6. Um estudo detalhado do mecanismo de ação é eminente e necessário para elucidar as diferenças encontradas nos resultados com Violaceína, Bromo-Violaceína e Metilol-Violaceína.

7. SUMÁRIO

A Doença de Chagas é uma infecção parasitária que afeta milhões de latino-americanos, causando nas áreas endêmicas, uma entre 10 mortes nos indivíduos de 25 a 64 anos de idade . A quimioterapia da doença é baseada principalmente no uso de dois medicamentos, Nifurtimox (Bay 2502 : Lampit) e Benznidazole (RO 7-1051 ; Radanil, Rochagan). Ambas as drogas possuem atividade genotóxica comprovada tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

Assim sendo, resolvemos investigar os efeitos citotóxicos do pigmento biossintético de *Chromobacterium violaceum* (Cepa BB-78), o 1,3-dihidro-2H-indol-2 ona, comumente denominado como Violaceína, bem como de seus derivados, Bromo-Violaceína e Metilol-Violaceína, já que este composto apresentou um perfil biológico interessante, mostrando-se com baixo poder hemolítico, ação microbiana e o mais importante, atividade tripanocida *in vitro*. Entretanto, Violaceína exibiu uma alta toxicidade para células V79/M8, assim como Bromo-Violaceína. Já o derivado Metilol-Violaceína exibiu uma citotoxicidade baixa em relação aos outros 2 compostos.

A atividade citotóxica de Nifurtimox e Benznidazole também foi testada em células V79/M8. Entretanto, estes 2 compostos se comportaram de maneira similar ao Metilol-Violaceína, tanto na sobrevivência celular, quanto para a inibição da síntese de DNA.

Sabe-se no entanto, que os efeitos tóxicos dos medicamentos são devidos à sua biotransformação nitrorredutiva para radicais que possam reagir com constituintes celulares, causando efeitos deletérios.

Dosagens preliminares realizadas durante o tratamento das células com Violaceína, indicaram a presença de H_2O_2 no meio reacional, apontando assim, para uma possibilidade de ser uma espécie responsável pelos efeitos cito e genotóxicos encontrados nestes estudos.

7. SUMMARY

Chagas'Disease is a parasitic infection that affects million of Latinamericans, inducing in endemic areas one in ten deaths in humans between 25 to 64 years old. Disease's chemotherapy is based on the use of two drugs, Nifurtimox (Bay 2502 : Lampit) and Benznidazole (R0 7-1051 ; Radanil : Rochagan). Both drugs have a confirmed genotoxic activities in vitro and in vivo.

We decided to test the cytotoxic effects of the biosynthetic pigment of *Chromobacterium violaceum* (strain BB-78), usually known as Violacein, as well as its derivatives, Br-Violacein and Methyl-Violacein. This last compound has interesting biological profiles as low hemolytic effect, microbian action and principally in vivo trypanocide activity. Violacein and Br-Violacein exhibited a high toxicity in V79/M8 cells. The Methhyl-Violacein derivative showed a low cytotoxicity compared to the other two compounds.

Nifurtimox and Benznidazole cytotoxic activity was also tested in V79/M8 cells. However, the profile of both was similar to Methyl-Violacein in cellular survival and DNA inhibition synthesis experiments.

It is known that the toxic effects of those drugs are due to their nitroreductive biotransformation to reactive free radicals, interacting with cellular constituents causing the deleterious effects.

On preliminary studies using the incubation medium of Violacein treatments in V79/M8 cells we observed H_2O_2 formation, a reactive species that may be responsible for the detected cyto and genotoxic effects.

B.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames,B.N.; McCann,J. and Yamasaki,E. (1975). Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenecity test. *Mutation Res.* 31, 347-364.
- Ballantine,J.; Barret,C.; Beer,R.; Boggians,B.; Clark,K.;Eardley,B.; Jennings,B. and Robertson,A. (1957). *J. Chem. Soc.* 2222 .
- Boainnaim,E. (1979). Tratamiento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. *Rev. Goiana Med.* 25, 1-60 .
- Boisbaudran,L. (1882). Matière colorante se formant dans la colle da farine. *Compt. Rend.* 94, 562 .
- Boveris,A. and Stoppani,A.O.M. (1977). Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 33, 1306-1308 .
- Boveris,A.; Sies,H.; Martino,E.E.; Docampo,R.; Turrens,J.F. and Stoppani,A.O.M. (1980). Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 188, 643-648.
- Brener,Z. (1979). Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the western hemisphere. *Pharmacol. Ther.* 7, 71-90 .

Brener, Z. and Cançado, J.R. (1979). Terapêutica. In : Brener, Z. and Andrade, Z.A. eds. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan p.362-424 .

Burbank, W.D. (1942). Physiology of the ciliate *Colepodium coleoda*. I. The effect of various bacteria as food on the division rate of *Colepodium coleoda*. *Physiol. Zool.* 15, 342 .

Caldas, L.R. (1977). Photochemistry and Photobiology in virgin lands. *Photochem. Photobiol.* 26, 1-2 .

Caldas, L.R.; Leitão, A.A.C.; Santos, S.M. and Tyrrel, R.M. (1978). Preliminary experiments on the photobiological properties of Violacein. *Inter. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol.*, 121-126

Campos, V.; Erazo, S. and Durán, N. (1982). Novos fotoprodutos com atividade antimicrobiana de *Chromobacterium violaceum*. *Arq. Biol. tecnol.* 25, 147 .

Cançado, J.R.; Salgado, A.A.; dos Santos, J.F.C.; Batista, S.M. and Chiari, C. (1976). Clinical trials in Chagas disease. In : *American Trypanosomiasis Research*. Scientific Publication n.318 p. 266-271. Pan American Health Organization. Washington, D.C. .

Carpintero, J.D. (1983). Uso del ácido tióctico para la prevención de los efectos secundarios provocados por el Benznidazol en pacientes con infección de Chagas crónica. *Medicina* 43, 285-290 .

Cleveland,R.L. (1925). Woods Hole Mass. Biol. Bull. 48, 309 .

Cohen,M.S.; Erturk,E.; Van Esch,M.A.; Crovetti,J.A. and Bryan,G. T. (1975). Carcinogenicity of 5-nitrofurans and related compounds with amino-heterocyclic substituents. J. Natl. Cancer Inst. 54, 841-850 .

Collins,A.R.S.; Squires,S. and Johnson,R.T. (1982). Inhibitors of repair DNA synthesis. Nucl. Acids Res. 10, 1203-1213 .

Corpe,W.A. (1951). A study of the wide spread distribution of *Chromobacterium* species in soil by a simple technique. J. Bacteriol. 62, 515 .

De Castro,S.L.; Soeiro,M.N.C. and Meirelles,M.M.L. (1986). Effect of drugs on amastigotes and trypomastigotes of *L. cruzi* and on the interaction of heart muscle cell with bloodstream trypomastigotes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81, 154 .

De Moss,R.D. and Evans,N.R. (1959). Physical aspects of Violacein biosynthesis in non-proliferating cells. J. Bacteriol. 78, 583-588 .

De Moss,R.D. (1967). Violacein. Antibiotics 2, 77-81 .

Dias,P.J.C. (1984). Enfermedad de Chagas. Epidemiologia Clinica Terapeutica,10-84. Programa de Salud Humana, Buenos Aires

Docampo, R. and Stoppani, A.O.M. (1979). Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by Nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. Arch. Biochem. Biophys. 197, 317-321 .

Docampo, R. (1980). Generation of free radicals from Nifurtimox in *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. In: Van den Bossche, H. ed.. The Host-Invader Interplay. Amsterdam, Elsevier, 677-681 .

Docampo, R. and Stoppani, A.O.M. (1980). Sobre el mecanismo de la acción tripanocida del Nifurtimox y otros nitroderivados en *Trypanosoma cruzi*. Medicina 50(1), 10-15 .

Docampo, R.; Mason, R.P.; Mottley, C. and Muñiz, R.P. (1981 a). Generation of free radicals induced by Nifurtimox in mammalian tissues. J. Biol. Chem. 256, 10930-10933 .

Docampo, R.; Moreno, S.N.J. and Stoppani, A.O.M. (1981 b). Nitrofurant enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 207, 316-324 .

Docampo, R. and Moreno, S. (1984). Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. Rev. Infect. Dis. 6, 223-238 .

Docampo, R. and Moreno, S.N.J. (1985). Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and

chemoprophylaxis of American trypanosomiasis. In : Reviews in Biochemical Toxicology. Hodgson, E.; Bend, J.R.; Philpot, R.M. eds.. New York, Elsevier Science Publishing Co. p. 159-204 .

Docampo, R. and Moreno, S.N.J. (1986). in Free Radicals in Biology. W.A. Pryor, ed.. Academic Press, New York. pp 243-288 .

Durán, N. and Faljoni-Alario, A. (1978). Química de bacterias: Estudio fotoquímico de *Chromobacterium violaceum*. Cienc. e Cult. 30, 609 .

Durán, N. and Faljoni-Alario, A. (1980) . Bacterial chemistry of a potential phototherapeutic substance from *C. violaceum*. An. Acad. Brasil. Cienc. 52, 297-302.

Durán, N.; Erazo, S. and Campos, V. (1983). Bacterial chemistry II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. An. Acad. Brasil. Cienc. 55, 231-234 .

Durán, N. (1989). A bioprocess and synthesis of antimicrobial and trypanocide products from *Chromobacterium violaceum* (Brazilian strain) US. Patent Submitted.

Durán, N.; Campos, V.; Riveros, R.; Joyas, A.; Erazo, S. and Haun, M. (1989). Bacterial chemistry III: preliminary studies on tripanocide activities of *Chromobacterium violaceum* products. An. Acad. Brasil. Cienc. 36 , 31-36.

Dvorak, J.A. and Howe, C.L. (1977). The effects of Lampit (Bayer 2502) on the interaction of *Trypanosoma cruzi* with vertebrate cells in vitro. The Amer. J. Trop. Med. Hyg. 26, 58-63 .

Ebringer, L. and Bencova, M. (1980). Mutagenicity of nitrofurantoin drugs in bacterial systems. Folia Microbiologica 25, 388-396 .

Fairlamb, A.H. and Cerami, A. (1985). Mol. Biochem. Parasitol. 14, 187-198.

Fairlamb, A.H. ; Blackburn, P. ; Ulrich, P. ; Chait, B.T. and Cerami, A. (1985). Science 227, 1485-1487.

Ferreira, R.C.C. and Ferreira, L.C.S. (1986 a). Avaliação do potencial mutagênico - carcinogênico de fármacos pelo ensaio Salmonella/fracção microsossomal. I. Mutagenicidade de drogas anti *T. cruzi*. Cienc. Cult. 38, 696-702 .

Ferreira, R.C.C. and Ferreira, L.C.S. (1986 b). Mutagenicity of Nifurtimox and Benznidazole in the Salmonella microsome assay. Brazilian J. Med. Biol. Res. 19, 19-25 .

Filardi, A.H. and Brener, Z. (1982). A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Ann. Trop. Med. Parasitol. 76, 293-297 .

Filardi,A.H. and Brener,Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of a *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81, 755-759 .

Ford,P. and Yerganian,A. (1958). Observations on the chromossomes of chinese hamster cells in tissue culture. J. Natl. Cancer Inst. 21, 393-425 .

Fridovich,I. (1976). Oxygen radicals,hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In: Pryor,W.A.,ed. Free Radical in Biology.New York, Academic V. 1,p. 239-277 .

Fridovich,I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 239-257 .

Friedberg,E.C. (1985). DNA Repair.New York,Freeman,p.54-59 .

Gilman,J. (1953). Studies on certain species of bacteria assigned to the genus Chromobacterium. J. Bacteriol. 65, 48-52 .

Gorla,N.B. and Castro,A.J. (1985). Micronucleus formation in bone marrow of mice treated with Nifurtimox or Benznidazole. Toxicol. Lett. 25, 259-263 .

Gorla,N.B.; Diaz Gomes,I.M. and Castro,A.J. (1986). Interaction of Benznidazole with DNA and nuclear proteins from rat liver.

Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 280, 22-31 .

Gorla, N.B. (1987). Sister chromatid exchange in splenic lymphocytes of mice after exposure to Nifurtimox or Benznidazole. Mutation Res. 188, 129-133 .

Gorla, N.B.; Ledesma, S.O.; Barbieri, P.G. and Larripa, B.I. (1988). Assesment of cytogenetic damage in chagasic children treated with Benznidazole. Mutation Res. 206, 217-220 .

Gorla, N.B.; Ledesma, S.O.; Barbieri, P.G. and Larripa, B.I. (1989) Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with Nifurtimox. Mutation Res. 224, 263-267 .

Grupta, R.S.; Bromke, A.; Bryant, D.W.; Grupta, B.; Singh, B. and McCalla, D.R. (1987). Etoposide (VP 16) and terriposide (VM 26) : novel anticancer drugs strongly mutagenic in mammalian but not prokaryotic test systems. Mutagenesis 2, 179-186 .

Gutteridge, W.E.; Ross, J.; Hargadon, M.R.J and Hudson, J.E. (1982). *Crithidia fasciculata* : a catalase-containing trypanosomatid sensitive to nitroheterocyclic drugs. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. 76(4), 493-496 .

Haberkorn, A. and Gonnert, R. (1972). Animal experimental investigation into the activity of Nifurtimox against *Trypanosoma*

cuzi. *Arzneim-Forsch* 22(9a), 1570-1582 .

Hall, J.D. and Mount, D.W. (1981). Mechanisms of DNA replication and mutagenesis in ultraviolet irradiated bacteria and mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 25, 53-126 .

Hartley, W. (1913). On a violet colouring-matter and its production by a certain bacterium. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.* 144, 63 .

Haun, M.; Pereira, M.F.; Hoffmann, M.E.; Joyas, A. ; Campos, V.; Filardi, L.D.S.; De Castro, S. and Durán, N.. *Bacterial Chemistry VI: Biological activities and citotoxicity of 1,3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives*. Submitted Artivos de Biologia, Medicina Experimentales. Santiago-Chile. (Novembro de 1990).

Henderson, G.B.; Ulrich, P.; Fairlamb, A.H.; Rosenberg, I.; Pereira, M.; Sela, M. and Cerami, A. (1988). Suversive substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5374-5378 .

Kidder, G.M. and Stuart, C.A. (1939). Growth studies on ciliates. I. The role of bacteria in the growth and reproduction of colpoda. *Physiol. Zool.* 12, 329 .

Knight,R.C.; Skolimowski,I.M. and Edwards,D.I. (1978). The interaction of reduced metronidazole with DNA. Biochem. Pharmacol. 27, 2089-2093 .

Knox,R.J.; Knight,R.C. and Edwards,D.I. (1981). Misonidazole-induced thymidine release from DNA. Biochem. Pharmacol. 30, 1925-1929 .

Laplumé,H.; Barosse,P.A. and Cabrera,H. (1985). Efectos indeseables de Nifurtimox y Benznidazol. Medicina 82, 42-55.

Lasseur,PH. and Girardet,R. (1926). Contribution a l'étude des pigments microbiens. Bull. Trimestriel Soc. Sci. Nancy,3 (Series 4), 1-77 .

Lehninger,A.L. (1982). In Principles of Biochemistry. Worth Publishers,INC. New York, N.Y..

Letendre,C.; Dickens,G. and Guroff,J. (1974). The tryptophan hydroxylase of *Chromobacterium violaceum*. J. Biol. Chem. 249 (22) 7186. .

Lichstein,H.C. and van de Sand,V.F. (1945). Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. J. Infectious Diseases 76 (1) 47-51.

Masana,M.; Toranzo,D.G.E. and Castro,A.J. (1984). Reductive metabolism and activation of Benznidazole. *Biochem. Pharmacol.* 33(7), 1041-1045 .

McCalla,D.R. (1983). Mutagenecity of nitrofurán derivatives. *Environ. Mutagen.* 5, 745-765 .

McLane,K.E.; Fisher,J. and Ramakrishnan,K. (1983). Reductive drug metabolism. *Drug Metab. Rev.* 14(4), 741-799 .

Mitoma,C.; Weissbach,H. and Udenfriend,S. (1955). Formation of 5-hydroxytryptophan from tryptophan by *Chromobacterium violaceum* *Nature (London)* 175 (4466), 994-995.

Moncaya,A. (1986). Research activities of the scientific working group (SWG) on Chagas disease.1982-1985,UDP/World Bank/Who. Special Program,Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81, 181-244 .

Moreno,S.N.J.; Docampo,R.; Mason,R.P.; Leon,W. and Stoppani,A.O. M. (1982). Different behaviors of Benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 218(2), 585-591 .

Moreno,S.N.J. and Docampo,R. (1985). Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. *Environ. Health Perspec.* 64, 199-208 .

Muel,B. and Santos,S.M. (1978). Physiochemical properties of Violacein. Inter. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol. 127-132 .

Muller,W.E.G.; Rhode,H.J.; Beyer,R.; Maidhof,A.; Lachmann,M.; Taschner,H. and Zahn,R.K. (1975). Mode of action of 9-B-D-arabinofuranosyladenine on the synthesis of DNA,RNA and protein in vitro and in vivo. Cancer Res. 35, 2160-2168 .

Nagel,R. (1987). Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. Mutation Res. 191, 17-20 .

Nagel,R. and Nepomnaschy,I. (1983). Mutagenecity of 2-anti-chagasic drugs and their metabolic deactivation. Mutation Res. 117, 237-242 .

Nakagawa,M. ; Okajima,H. and Hino,T. (1976). J. Amer. Chem. Sr. 98, 635-637.

Nakazawa,H.; Enei,H.; Okurmura,S. Yashida,H. and Yamada,H.(1972). FEBS. Lett. 25, 43-47 .

Olive,P.L. (1979). Inhibition of DNA synthesis by nitroheterocycles. II. Mechanisms of cytotoxicity. Br. J. Cancer 40, 94-104 .

Packchanian,A. (1957). Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurantoin compounds. Antibiot. Chemother. 7(1),

13-23 .

Painter,R.B. (1977). Rapid test to detect agents that damage human DNA. Nature (London) 265, 650-651 .

Painter,R.B. (1978). Inhibition of DNA replicon initiation by 4-nitroquinoline 1-oxide, adriamycin and ethyleneimine. Cancer Res. 38, 4445-4449 .

Painter,R.B. and Young,B.R. (1980). Radiosensitivity in ataxia telangiectasia: a new explanation. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 7315-7317 .

Painter,R.B. and Howard,R. (1982). The Hela DNA synthesis inhibition test as a rapid screen for mutagenic carcinogens. Mutation Res. 92, 427-437 .

Painter,R.B. (1985). Inhibition of mammalian DNA synthesis by ionizing radiation. Int. J. Radiat. Biol. 49, 771-781 .

Peterson,F.J.; Maosn,R.P.; Hovsepian,J. and Hottzman,J.L. (1979). Oxygen sensitive and insensitive nitroreduction by *E. coli* and rat hepatic microsomes. J. Biol. Chem. 254, 4009-4014 .

Plieninger, H. ; Sueheiro,T. ; Suhr,K. and Decker,M. (1955). Chem. Ber. 88, 370.

Pommier,Y.; Scharfs,R.E.; Kohn,W.K. and Zwelling,L.A. (1984). Formation and rejoining of deoxyribonucleic acid double strand breaks induced in isolated cell nuclei by antineoplastic intercalating agents. *Biochemistry* 23, 3194-3201 .

Reilly,J. and Pyne,G. (1927). On the pigment produced by *Chromobacterium violaceum* . *Biochem. J.* 21, 1059 .

Riveros,R.; Campos,V.; Joyas,A.; Erazo,S. and Durán,N. (1985). Bacterial chemistry : studies on trypanosomal activities of 1,3-hydro-2H-indol-3-one derivatives. *Arq. Biol. Tecnol.* 28, 61 .

Riveros,R.; Haun,M.; Campos,V. and Durán,N. (1987). Bacterial chemistry IV: Total characterization of Violacein. An antibiotic and trypanocide from *Chromobacterium violaceum*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* .

Rowley,D.A.; Knight,R.C.; Skolimowski,M.I. and Edwards,D.I. (1980). The relationship between misonidazole cytotoxicity and base composition of DNA. *Biochem. Pharmacol.* 29, 2095-2098 .

Rustia,M. and Shubik,P. (1972). Induction of lung tumor and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J. Natl. Cancer Inst.* 48, 721-729 .

Sartory,A.; Meyer,J. and Wealdele,J. (1983). Contribution à l'étude d'une violacéine obtenue à l'état cristallisé et provenant

d' un bacille violet isolé du pus d'un abcès dentaire. Compt. Rend. Soc. Biol. 206, 950 .

Sebek, O.K. and Jager, H. (1962). Divergent pathways of indole metabolism in *Chromobacterium violaceum*. Nature (London) 196, 793-795 .

Shames, L.S.; Fairlamb, H.A.; Cerami, A. and Walsh, T.C. (1986). Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. Biochemistry 25, 3519-3526 .

Silva, O.A.; Silva, A.A. and Malta, J.A. (1986). Etiologic treatment of chronic Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81, 153 .

Sims, P. and Gutteridge, W.E. (1978). Inhibitory action of a 5-nitrofurans (SQ 18506) against nucleic acid synthesis in *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Pharmacol. 27, 2815-2820 .

Spanó, M.A. and Takahashi, C.S. (1981). Genetic effects of Nifurtimox on *Drosophila melanogaster*, Wistar rats and *Allium cepa*. Brazilian J. Genetics 3, 357-366 .

Stratford, I.J.; O'Neill, P.; Sheldon, P.W.; Silver, A.R.J.; Walling, J.M. and Adams, G.E. (1986). RSU 1069, a nitroimidazole containing an aziridine group. Bioreduction greatly increases cytotoxicity

under hipoxic conditions. Biochem. Pharmacol. 35, 105-109 .

Strong, F.M. (1944). Isolation of Violacein. Science 100, 286-287

Suciu, D. (1990). Inhibition of DNA synthesis and cytotoxic effects of some DNA topoisomerase II and gyrase inhibitors in Chinese hamster V79 cells. Mutation Res. 243, 213-218 .

Tazima, Y.; Kada, T. and Murakami, A. (1975). Mutagenecity of nitrofurans derivatives including furylfuramide, a food preservative. Mutation Res. 32, 55-80 .

Teixeira, A.R.L.; Calixto, A.M.; Rizzo, V.L.; Córdoba, C.J. and Teixeira, L.M. (1985). Cancerigénese em camundongos tratados com compostos nitroderivados. XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo - Brasil .

Tobie, W.C. (1934). The pigment of *Bacillus violaceus*. I. The production, extraction and purification of Violacein. J. Bacteriol. 29, 223 .

Tomomura, A. and Sasaki, M. (1973). Chromosome aberrations and DNA repair synthesis in cultured human cells exposed to nitrofurans. Jpn. J. Genet. 48, 291-294 .

Van den Bossche, H. (1978). Chemotherapy of parasitic infections. Nature (London) 273, 626-630 .

Voogd,C.E.; Van der Stel,J.J. and Jacobs,A.J. (1975). The mutagenic action of nitroimidazoles. II. Effects of 2-nitroimidazoles. Mutation Res. 31, 149-152 .

Voogd,C.E.; Van der Stel,J.J. and Jacobs,A.J. (1979). The mutagenic action of nitroimidazoles.II- A comparison of the mutagenic action of several nitroimidazoles and some imidazoles. Mutation Res. 66, 207-221 .

Voogd,C.E. (1981). On the mutagenicity of nitroimidazoles. Mutation Res. 86, 243-247 .

Wardman,P. and Clarke, E.D. (1976). Oxygen inhibition of nitroreductase electron transfer from radical-anions to oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69(4), 942-945 .

Wojnarowski,M.J.; Sigmond,R.D. and Beerman,T.A. (1988). Topoisomerase II mediated lesions in nascent DNA : comparison of effects of epipodophyllotoxin derivatives,VM-26 and VP-16,and 9-anilinoacridine derivatives,m-AMSA and o-AMSA. Biochem. Biophys. Acta 950, 21-29 .