

Estela Sílvia Duarte Pedreiro

# Análise *In Silico* de Impurezas Provenientes da Síntese de Fármacos. Pesquisa de Estruturas de Alerta de Genotoxicidade, Mutagenicidade e Carcinogenicidade

Dissertação de Mestrado em *Design* e Desenvolvimento de Fármacos, orientada pela Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estela Sílvia Duarte Pedreiro

Análise *In Silico* de Impurezas Provenientes da Síntese de Fármacos.  
Pesquisa de Estruturas de Alerta de Genotoxicidade,  
Mutagenicidade e Carcinogenicidade

Dissertação de Mestrado em *Design* e Desenvolvimento de Fármacos, orientada pela Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo  
e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*“Todas as substâncias são venenos.  
A dose certa diferencia um veneno de um remédio.”*

Paracelsus  
(há mais de 500 anos)

*À minha filha Helena.*

## Agradecimentos

Agradeço ao meu marido e à minha família, especialmente à Susete, ao Helder e aos meus pais, pelo apoio que sempre me deram ao longo da minha vida académica e profissional.

Agradeço ao Doutor Marco Neves tudo o que me ensinou sobre tecnologias *in silico* durante o Mestrado de *Design* e Desenvolvimento de Fármacos.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo, pela supervisão deste trabalho.

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

## Resumo

Apesar da existência de requisitos regulamentares exigentes relativamente à pureza das substâncias para uso farmacêutico, a presença de impurezas provenientes dos processos de fabrico e dos seus produtos de degradação é por vezes inevitável. Essas impurezas podem ser substâncias reativas, com uma toxicidade indesejada, incluindo genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade, por esse motivo devem ser consideradas na avaliação de benefício-risco dos medicamentos.

As impurezas genotóxicas, mutagénicas e carcinogénicas, mesmo quando presentes em quantidades vestigiais, podem constituir um aspeto crítico no desenvolvimento de fármacos. Este aspeto, se não for corretamente gerido pode levar a suspensões ou a atrasos na aprovação dos medicamentos, por parte das Autoridades Reguladoras. Por outro lado, a retirada de um medicamento do mercado devido a reações adversas causadas por efeitos tóxicos não previstos para a substância ativa ou eventualmente pela presença de impurezas que não foram convenientemente detetadas e avaliadas, para além do impacto negativo na saúde dos doentes, causa importantes prejuízos financeiros e a degradação da imagem das empresas.

Deste modo, o conhecimento científico sobre as estruturas de alerta de toxicidade eventualmente presentes nas substâncias químicas e os efeitos tóxicos a que estas estão associadas, bem como a incorporação desta informação em programas informáticos (tecnologias *in silico*), estudados e validados para prever a genotoxicidade, a mutagenicidade e a carcinogenicidade das mesmas, são uma ferramenta importante, na medida em que permitem realizar menos ensaios toxicológicos em animais, economizar tempo e diminuir custos.

O objetivo deste trabalho é compreender os recentes avanços do conhecimento científico sobre alertas estruturais de toxicidade e a sua utilização nas tecnologias *in silico*, usadas para prever a genotoxicidade, a mutagenicidade e a carcinogenicidade das substâncias químicas para uso farmacêutico.

Como exemplo prático é apresentado um caso de análise toxicológica *in silico* das impurezas provenientes da síntese do pantoprazol sódico.

**Palavras-Chave:** Toxicologia *in silico*, QSAR, genotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, ICH M7.

## Abstract

Despite regulatory requirements concerning the purity of chemical substances for pharmaceutical use, the presence of impurities from their manufacturing processes or from their degradation processes are sometimes unavoidable. Even in residual amounts, these impurities can sometimes have undesirable genotoxic, mutagenic and carcinogenic effects that must be considered in the assessment of the beneficial-risk balance of drug products, in order to minimise the risk and assure security for the patients.

The use of scientific knowledge about structure alerts and their toxicological effects in validated computational programs (*in silico* technologies) to predict the genotoxic, mutagenic and carcinogenic effects of chemical substances is important. These programs are useful tools in the development and production of drug products, in order to design safer molecules, save time and reduce costs.

The aim of this work is to understand the state of the art of toxicological structure alerts and their use in computational programs (*in silico* technologies) to predict genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity of impurities potentially present in chemical substances for pharmaceutical use.

As an example of *in silico* analysis we present a case study of toxicological computational assessment of potential impurities from the synthesis of pantoprazole sodium.

**Key-Words:** *In silico* toxicology, QSAR, genotoxicity, mutagenicity, carcinogenicity, ICH M7.



# Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstrat.....	Viii
Índice.....	ix
Índice de tabelas.....	xii
Índice de figuras.....	xii
Abreviaturas.....	xiii
Definições.....	xiv
<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Objetivo do trabalho.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Evolução histórica.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Mecanismos de ação das substâncias químicas carcinogénicas e mutagénicas: perspetiva geral.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1. Carcinogénicos genotóxicos (reagem com O DNA).....</b>	<b>9</b>
<b>3.2. Carcinogéneos não genotóxicos.....</b>	<b>12</b>
<b>4. Mecanismos de ação e relações estrutura-atividade como base da toxicologia preditiva usada nas tecnologias <i>in silico</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>5. Sistemas informáticos especializados ou tecnologias <i>in silico</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>5.1. Tipos de modelos QSAR.....</b>	<b>22</b>
<b>5.2. Comparação dos modelos QSAR.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Aspectos importantes a considerar na utilização de modelos QSAR.....</b>	<b>25</b>
<b>6.1. A importância de compreender os mecanismos.....</b>	<b>25</b>
<b>6.2. Critérios para avaliar a validade e o valor científico do modelo QSAR.....</b>	<b>26</b>
<b>6.3. Limitações dos modelos QSAR.....</b>	<b>27</b>
<b>6.4. Confiança na previsão.....</b>	<b>27</b>
<b>6.5. Fatores de mitigação.....</b>	<b>28</b>
<b>6.6. Domínio de aplicação ou cobertura.....</b>	<b>29</b>
<b>6.7. Utilização da abordagem <i>read-across</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>7. Processo de avaliação do risco das impurezas.....</b>	<b>30</b>

<b>8. Relatório QSAR</b> .....	32
<b>8.1. Materiais e métodos</b> .....	34
<b>8.2. Resultados e conclusões</b> .....	34
<b>8.3. Anexos</b> .....	35
<b>9. Estudo de caso. O exemplo da síntese do pantoprazol sódico</b> .....	35
<b>9.1. Software VEGA</b> .....	38
<b>9.2. Resultados obtidos com o software VEGA</b> .....	38
<b>9.3. Discussão dos resultados</b> .....	45
<b>Conclusão</b> .....	47
<b>Bibliografia</b> .....	49

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Alertas estruturais de carcinogenicidade e mecanismos de ação.....	16
Tabela 2 – Alertas estruturais em compostos reconhecidamente carcinogénicos no Homem.....	21
Tabela 3 – Resumo das características do <i>software</i> e respetivas versões usadas.....	24
Tabela 4 – Classificação das impurezas relativamente ao seu potencial mutagénico e carcinogénico e respetivas ações de controlo propostas.....	31
Tabela 5 – Bases de dados sobre compostos carcinogénicos e mutagénicos.....	32
Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos com o <i>software</i> VEGA.....	39
Tabela 7 – Resumo da discussão dos resultados e conclusão integrada.....	45

## Índice de figuras

Figura 1 – Exemplos de grupos funcionais com SAs, conhecidos por estarem envolvidos em reações com o DNA.....	7
Figura 2 – Numeração dos átomos das bases do DNA.....	9
Figura 3 – Características estruturais das classes químicas listadas na tabela 2.....	17
Figura 4 – Exemplo de árvore de decisão para utilização do conhecimento especializado em casos de previsões QSAR negativas.....	33
Figura 5 – Esquema do processo de síntese do pantoprazol sódico.....	36
Figura 6 – Esquema do processo de síntese do 2-mercapto-5-difluorometoxi-1H-benzimidazol.....	37

## Abreviaturas

ADI: *Allowable Daily Intake* (Ingestão diária permitida)

DNA: *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

ALARP: *As Low As Reasonably Practicable* (Tão baixo quanto praticável)

CHMP: *Committee for Medicinal Products for Human Use*

EMA: *European Medicines Agency*

FDA: *Food and Drug Administration*

ICH: *International Conference on Harmonisation*

LOEL: *Lowest-Observed-Effect Level* (Nível de efeito observado mais baixo)

MTD: *Maximum Tolerated Dose* (Dose máxima tolerável)

NOEL: *No-Observed Effect Level* (Nível de efeito não observado)

OCDE: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económicos

PDE: *Permitted Daily Exposure* (Exposição diária permitida)

PAH: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos)

QSAR: *Quantitative Structure-Activity Relationships* (Relações Estrutura-Atividade quantitativas ou Quantificação das relações estrutura-atividade)

SAs: *Structural Alerts* (Alertas estruturais)

SAR: *Structure-Activity Relationships* (Relações estrutura-atividade)

SWP: *Safety Working Party*

TDI: *Total Daily Intake* (Ingestão diária total)

TTC: *Threshold of Toxicological Concern*

**Observação:** Como a maior parte das siglas usadas neste trabalho resultam de designações e termos técnicos em inglês, não foi efetuada a sua tradução para português, de modo a facilitar a compreensão do texto.

## Definições

**Alerta estrutural ou estrutura de alerta:** no contexto deste trabalho, é um grupo químico ou (sub)estrutura de uma molécula associado a mutagenicidade <sup>(1)</sup>.

**Aneuploidia:** perda ou ganho de cromossomas <sup>(2)</sup>.

**Conhecimento especializado (*expert knowledge*):** no contexto deste trabalho, entende-se como conhecimento especializado a revisão dos dados pré-existentes e o uso de qualquer outra informação relevante para avaliar a exatidão dos modelos *in silico* preditivos de mutagenicidade <sup>(1)</sup>.

**Genotoxicidade:** termo geral que se refere a qualquer efeito nocivo no material genético, independentemente do mecanismo pelo qual a alteração é introduzida <sup>(3)</sup>.

**Impureza:** numa substância para uso farmacêutico, qualquer composto além da entidade química definida como sendo essa substância <sup>(4)</sup>.

**Impureza genotóxica:** é uma impureza que demonstrou ser genotóxica num teste modelo apropriado, isto é, num teste bacteriano de mutação de genes (teste de Ames) <sup>(5)</sup>.

**Impureza mutagénica:** impureza que demonstrou ser mutagénica num teste modelo de mutagenicidade apropriado, por exemplo o ensaio de mutagenicidade em bactérias <sup>(1)</sup>.

**Impureza potencialmente genotóxica:** é uma impureza que possui estruturas de alerta mas que não foi testada num modelo experimental. Neste contexto o termo “potencial” refere-se à genotoxicidade e não à presença ou ausência da impureza <sup>(5)</sup>.

**Limiar:** dose de uma substância ou concentração de exposição abaixo da qual um determinado efeito não é observado ou não se espera que ocorra <sup>(1)</sup>.

**Mutação genética:** alteração permanente detetável num gene ou na regulação da sua sequência. As alterações podem ser mutações, inserções ou supressões <sup>(3)</sup>.

**Mutagenicidade:** capacidade de induzir danos genéticos transmissíveis, que incluem mutações genéticas, aberrações cromossómicas e alterações no número dos cromossomas. As mutações genéticas são provocadas por interações com o DNA, enquanto outro tipo de

mutações podem derivar de interações tanto com o DNA como com outros alvos celulares, como por exemplo as proteínas <sup>(2)</sup>.

**Predictividade positiva:** no contexto deste trabalho, é a probabilidade de uma substância química ser carcinogénica quando contem um dado alerta estrutural. É calculado como a razão entre o número de substâncias positivas contendo determinado alerta estrutural e o número total de substâncias com o mesmo alerta estrutural <sup>(2)</sup>.

**Produto intermédio:** material produzido durante os passos da síntese da substância ativa que será sujeito a transformação posterior, antes de formar a substância ativa <sup>(6)</sup>.

**Qualificação (de impurezas):** processo de aquisição e de avaliação dos dados que estabelecem a inocuidade biológica de uma impureza especificada ou de um determinado perfil de impurezas no teor ou teores especificados <sup>(7)</sup>.

**Relações estrutura-atividade (SAR):** no contexto deste trabalho, são as relações entre a (sub)estrutura da molécula e a sua atividade mutagénica usando relações estrutura-atividade derivadas de dados experimentais <sup>(1)</sup>.

**Relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR):** no contexto deste trabalho, são as relações entre a (sub)estrutura da molécula e a sua atividade mutagénica usando relações estrutura-atividade quantitativas derivadas de dados experimentais <sup>(1)</sup>.

**Substância:** toda a matéria seja qual for a sua origem, humana, animal, vegetal ou química <sup>(8)</sup>.

**Substância ativa nova:** entidade designada terapêutica que ainda não se encontra registada numa região ou estado membro (também designada como nova entidade molecular ou nova entidade química). Pode ser um complexo, um simples éster ou sal de uma substância ativa previamente aprovada <sup>(6)</sup>.

**Substâncias para uso farmacêutico:** são substâncias orgânicas ou inorgânicas utilizadas como substâncias ativas ou como excipientes na produção de medicamentos para uso humano ou veterinário <sup>(4)</sup>.

**Substância reativa para o DNA:** substância com potencial para induzir danos no DNA, através de uma reação química com o DNA <sup>(1)</sup>.

## Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde a incidência mundial de cancro aumentará 50% até 2020, se não forem tomadas medidas preventivas. Esta tendência tem-se verificado tanto em países desenvolvidos como nos países em vias de desenvolvimento <sup>(2)</sup>.

Os mais recentes estudos realizados sobre esta matéria indicam que uma grande percentagem dos cancros tem causas ambientais, onde se incluem fatores como, o estilo de vida, a dieta, os hábitos tabágicos, a poluição e a exposição a produtos químicos nos locais de trabalho. Sabe-se ainda que um dos fatores essenciais para o desenvolvimento do cancro é a exposição a substâncias químicas <sup>(2)</sup>.

A identificação da toxicidade das substâncias químicas representa um desafio importante nas primeiras etapas de investigação e desenvolvimento de fármacos <sup>(9)</sup>. Além disso, a avaliação do perfil de impurezas de uma substância para uso farmacêutico e dos respetivos efeitos tóxicos é uma das etapas do desenvolvimento de medicamentos seguros e efetivos, que precede a sua introdução no mercado <sup>(6) (10)</sup>.

Apesar da existência de requisitos regulamentares exigentes relativamente à pureza das substâncias para uso farmacêutico, a presença de impurezas provenientes dos processos de fabrico e dos seus produtos de degradação é por vezes inevitável. Essas impurezas podem ser substâncias reativas, com uma toxicidade indesejada, incluindo genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade, por esse motivo devem ser consideradas na avaliação de benefício-risco dos medicamentos <sup>(11)</sup>.

A qualificação das impurezas da substância ativa é normalmente realizada testando lotes da substância contendo as impurezas em estudos toxicológicos pré-clínicos durante o desenvolvimento, de tal modo que a avaliação dos efeitos da substância ativa incluem também a contribuição que resulta da presença das impurezas. Mas, quando não são usados os mesmos lotes nos estudos pré-clínicos e clínicos, quando os processos de síntese sofrem alteração e quando estão presentes uma ou mais impurezas novas acima do limiar de qualificação nos lotes clínicos ou nos lotes para comercialização, podem ser requeridos estudos de qualificação específicos <sup>(12)</sup>.

A identificação e o controlo das impurezas genotóxicas e mutagénicas no processo de síntese é um desafio permanente, devido à natureza evolutiva e à quantidade de variáveis



envolvidas. Por esse motivo, as vias de síntese devem ser rastreadas para a identificação de alertas estruturais de genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. Se este tipo de estruturas forem encontradas nas impurezas, devem ser realizados esforços para eliminar ou reduzir os teores dessas impurezas até aos níveis considerados seguros, de acordo com o princípio ALARP (*As Low As Reasonably Practicable*) e devem ser desenvolvidas vias de síntese alternativas, com níveis de impurezas devidamente controlados. Se tal não for tecnicamente possível, então devem ser implementados limites baseados no conceito do TTC (*Threshold of Toxicological Concern*) ou no PDE (*Permitted Daily Exposure*), consoante a classificação da impureza. Estes limites geralmente são baixos e requerem o desenvolvimento de métodos analíticos com sensibilidade e especificidade adequadas. Além disso, as impurezas têm de ser abordadas de modo contínuo durante o desenvolvimento dos processos de síntese. Se a via de síntese for alterada, é necessário avaliar os novos produtos intermédios. Se os limites de aceitação toxicológicos forem alterados, devido a alterações na dose máxima diária do medicamento, a capacidade do processo para eliminar as impurezas e a capacidade dos métodos analíticos para as controlar com os novos limites entretanto estabelecidos, devem ser também reavaliados<sup>(5)</sup>.

As impurezas genotóxicas e mutagénicas, mesmo quando presentes em quantidades vestigiais, podem constituir um aspeto crítico no desenvolvimento dos medicamentos. Este aspeto, se não for corretamente gerido pode levar a suspensões ou a atrasos na aprovação por parte das Autoridades Reguladoras<sup>(13)</sup>.

Por outro lado, a retirada de um medicamento do mercado devido a reações adversas causadas por efeitos tóxicos não previstos para a substância ativa ou eventualmente pela presença de impurezas que não foram convenientemente detetadas e avaliadas, para além do impacto negativo na saúde dos doentes, causa importantes prejuízos financeiros e a degradação da imagem das empresas.

Outro campo onde o tema da toxicologia preditiva também é importante, é na toxicologia ambiental ou ecotoxicologia que avalia o risco ambiental dos produtos produzidos ao nível industrial. Neste setor é igualmente crítica a utilização de substâncias tóxicas, no que diz respeito aos prejuízos para o ambiente, para a saúde do Homem e dos restantes seres vivos<sup>(9)</sup>.

Deste modo, o conhecimento científico sobre as estruturas de alerta de toxicidade eventualmente presentes nas substâncias químicas e os efeitos tóxicos a que estas estão associadas, bem como a incorporação desta informação em programas informáticos (tecnologias *in silico*) estudados e validados para prever a genotoxicidade, a mutagenicidade e a carcinogenicidade das substâncias químicas para uso farmacêutico, são uma ferramenta importante, na medida em que permitem realizar menos ensaios toxicológicos em animais, economizar tempo e diminuir custos.

## **1. Objetivo do trabalho**

O presente trabalho tem como objetivo compreender os recentes avanços do conhecimento científico sobre alertas estruturais de toxicidade e a sua utilização nas tecnologias *in silico* usadas para prever a genotoxicidade, a mutagenicidade e a carcinogenicidade das substâncias químicas para uso farmacêutico.

Como exemplo prático é apresentado um caso de análise toxicológica *in silico* das impurezas provenientes da síntese do pantoprazol sódico.

## **2. Evolução histórica**

O estudo dos mecanismos de ação das substâncias químicas que induzem o cancro tem tido um papel central na compreensão e na prevenção desta doença, mas as evidências experimentais desses mecanismos ainda são escassas<sup>(2)</sup>.

Numa perspetiva histórica pode dizer-se que o primeiro marco da investigação neste campo foi o aparecimento da teoria eletrofílica da carcinogénese das substâncias químicas, desenvolvida por James e Elizabeth Miller, que explica a atividade da grande maioria das substâncias carcinogénicas em animais, conhecidas até aos anos 70. Inicialmente, estes investigadores notaram a eletrofilia dos agentes carcinogénicos alquilantes. Depois, observaram a carcinogenicidade dos agentes acilantes que também são eletrófilos. Na altura estes cientistas ficaram impressionados pela variedade de químicos carcinogénicos com diferentes estruturas que são metabolizados em eletrófilos reativos. Perante esta evidência concluíram que “a maior parte, se não todas as substâncias químicas carcinogénicas são

eletrófilas, ou então, são convertidas *in vivo* em derivados eletrófilos reativos que por sua vez se combinam com os grupos nucleófilos dos componentes fundamentais dos tecidos, tais como os ácidos nucleicos e as proteínas”<sup>(2)</sup>.

Para melhor compreensão deste trabalho importa recordar alguns conceitos. Uma substância diz-se carcinogénica ou cancerígena quando é capaz de induzir o aparecimento de um carcinoma no organismo.

O termo mutagenicidade indica a capacidade de induzir danos genéticos transmissíveis que incluem, mutações genéticas, aberrações cromossómicas e alterações no número dos cromossomas. As mutações genéticas são provocadas por interações com o DNA, enquanto outro tipo de mutações podem derivar de interações tanto com o DNA como com outros alvos celulares (como por exemplo as proteínas)<sup>(2)</sup>.

Por sua vez a genotoxicidade é um termo mais abrangente do que a mutagenicidade. Para além dos efeitos mutagénicos (permanentes e transmissíveis) a genotoxicidade inclui também efeitos no material genético que podem originar mutações (danos no DNA) não transmissíveis às células filhas<sup>(2)</sup>.

A teoria de que as substâncias químicas eletrófilas podem ser tanto mutagénicas como carcinogénicas e de que a mutagenicidade pode ser um passo no processo de carcinogénese surgiu após a investigação dos mecanismos da carcinogénese e a pesquisa, em larga escala, da mutagenicidade das substâncias químicas<sup>(2)</sup>.

A conclusão de que as substâncias mutagénicas são carcinogénicas só aconteceu depois de Heinrich Malling ter demonstrado que a fração S30 do fígado é capaz de transformar metabolicamente muitos carcinogénicos não mutagénicos em mutagénicos e depois de Bruce Ames ter usado sistematicamente uma fração S9 do fígado num ensaio bacteriano para criar uma grande base de dados de compostos mutagénicos que também são carcinogénicos<sup>(2)</sup>.

Enquanto a prova principal e definitiva de que uma substância química é carcinogénica no Homem deriva de estudos observacionais realizados em humanos, recolhidos através de estudos epidemiológicos, a maioria dos carcinogénicos é identificada em estudos animais. Assim, as experiências com animais são a principal fonte de informação sobre substâncias carcinogénicas. Contudo, os ensaios em roedores são dispendiosos, morosos e envolvem um grande número de animais. Neste contexto, foi particularmente importante a

investigação desenvolvida com o objetivo de criar alternativas mais rápidas e mais baratas aos ensaios realizados em roedores. Muitos investigadores contribuíram para este propósito <sup>(2)</sup>.

Bruce Ames criou séries geneticamente modificadas de estirpes bacterianas de *Salmonella typhimurium* <sup>(2)</sup>. O teste de Ames, como ficou conhecido o ensaio da *Salmonella typhimurium*, é um teste *in vitro*, validado, geralmente utilizado para o *screening* inicial de genotoxicidade e em particular na atividade indutora de mutações <sup>(14)</sup>. Consiste num conjunto de estirpes bacterianas que são sensíveis a um grande número de agentes causadores de danos no DNA. Cada estirpe tem alguma sensibilidade para classes específicas de substâncias químicas carcinogénicas (por exemplo, agentes alquilantes ou acilantes) <sup>(2)</sup>.

No teste de Ames, as mutações de desvio da estrutura ou substituições dos pares de bases podem ser detetadas pela exposição de estirpes de *Salmonella typhimurium* dependentes de histidina a um determinado composto que se pretende testar. Quando essas estirpes são expostas a um composto mutagénico, as mutações reversas restauram a capacidade da bactéria para sintetizar histidina e crescer em meio deficiente neste aminoácido <sup>(14)</sup>.

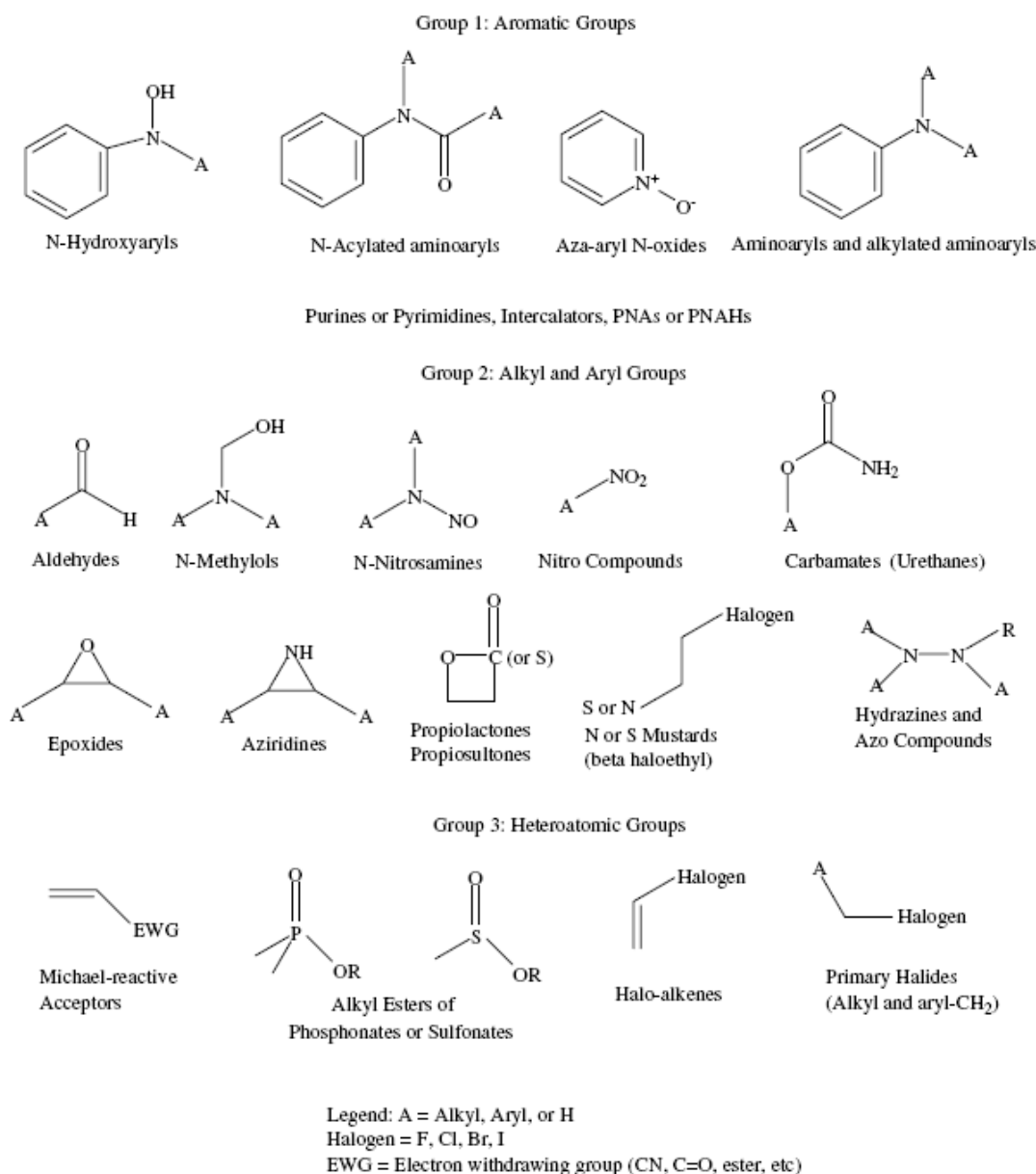
Devido ao facto de a maioria dos carcinogénicos conhecidos na altura atuarem através de mecanismos genotóxicos, a atividade dos carcinogénicos mutagénicos na *Salmonella* tornam a hipótese de James e Elizabeth Miller quase sempre plausível <sup>(2)</sup>.

A aplicação do teste de Ames a um grande número de substâncias ou produtos químicos demonstrou que este ensaio tem uma preditividade positiva elevada para químicos carcinogénicos que reagem com o DNA. No entanto, um resultado negativo não tem valor discriminatório. Um produto químico com resultado negativo no teste de Ames pode ser, com igual probabilidade, não carcinogénico ou carcinogénico não genotóxico. Deve ser realçado que o excelente desempenho do teste de Ames na identificação de carcinogénicos se deve ao seu brilhante *design*: foi construído com o propósito de detetar uma gama de classes de substâncias químicas que reagem com o DNA. Contudo, a correlação entre o teste de Ames e a carcinogenicidade é válida apenas para uma resposta do tipo positiva ou negativa. A potência mutagénica e a carcinogénica não apresentam correlação. Assim, apenas o passo limitante da velocidade de interação entre a substância química e a célula é comum aos dois processos <sup>(2)</sup>.

De acordo com esta perspectiva, a carcinogénese química é um processo multifásico e multifatorial que consiste em três passos operacionais: iniciação, promoção e progressão. A iniciação parece envolver um evento mutacional que pode incluir uma mutação genética, uma aberração cromossómica, translocação e instabilidade. A promoção envolve a expansão clonal de células iniciadas para atingir uma massa crítica, através por exemplo, de proliferação, inibição da morte celular programada, inflamação crónica persistente, inibição da diferenciação terminal e perda de controlo do crescimento. A progressão pode envolver um segundo evento mutacional, a perda do gene supressor do tumor, diminuição da supervisão imunitária e aquisição de capacidade para metastizar. O teste de Ames baseado na mutação de genes deteta substâncias químicas potencialmente capazes de realizar o primeiro passo da carcinogénese mas não é sensível a fatores que afetem os passos posteriores. A disjunção entre a via que conduz à expressão de mutações na *Salmonella* e o que leva à promoção e progressão do tumor em animais, após o primeiro passo de reação com o DNA, é responsável pela falta de correlação entre as potências tóxicas nos dois sistemas de teste <sup>(2)</sup>.

Outro contributo importante foi dado por John Ashby, e resultou na definição e compilação de alertas estruturais (SAs) seguindo a teoria eletrofílica de James e Elizabeth Miller. Os alertas estruturais de carcinogenicidade são definidos como subestruturas ou grupos funcionais da molécula que estão ligados à atividade carcinogénica dos químicos <sup>(2)</sup>.

A figura seguinte apresenta alguns exemplos, não exaustivos, de grupos funcionais com SAs, conhecidos por estarem envolvidos em reações com o DNA <sup>(11)</sup>.



**Figura 1** – Exemplos de grupos funcionais com SAs, conhecidos por estarem envolvidos em reações com o DNA.

Assim, os SAs identificam classes químicas potencialmente capazes de causar cancro. Sendo o ataque ao DNA, ou a sua modificação, o passo principal do mecanismo de ação de muitos carcinogéneos, os SAs relativos a tais classes de carcinogéneos são também válidos para o *end point* de mutagenicidade da *Salmonella* <sup>(2)</sup>.

Os brilhantes resultados obtidos com o teste de Ames convenceram a comunidade científica de que existe correlação entre carcinogenicidade química e mutagenicidade e que é possível aumentar essa correlação considerando também eventos genéticos diferentes dos que estão na base do teste de Ames (isto é, substituições, supressões ou adições de bases). Assim,

foram desenvolvidos outros ensaios de genotoxicidade, baseados em eventos tais como aberrações cromossômicas (quebra ou rearranjo) e aberrações cromossômicas numéricas (perda ou ganho de cromossomas, definido como aneuploidia). Além disso, uma vez que o teste de Ames usa bactérias, foram também propostos testes complementares ao da *Salmonella*, estendendo os sistemas experimentais às células de mamíferos, *in vitro*, assim como a outros ensaios *in vivo* <sup>(2)</sup>.

Contudo, apesar de vários ensaios de genotoxicidade terem sido usados e terem ganho popularidade, falharam em estudos comparativos realizados para demonstrar a correlação e a capacidade preditiva relativamente à carcinogénese em roedores. De facto, a correlação entre cancro e mutações parece ser válida apenas para algumas substâncias químicas, ou seja, as que reagem com o DNA. Esta correlação não se mantém em substâncias com resultados negativos no teste de Ames e que não têm alertas estruturais de reatividade para o DNA, mesmo admitindo que possam induzir mutações em sistemas diferentes dos da *Salmonella* (como por exemplo, aberrações cromossômicas, ou aneuploidia) <sup>(2)</sup>.

Apesar destes dados, deve ser realçado que a hipótese original da reatividade eletrofílica das substâncias químicas carcinogénicas se mantém válida e tem sido incorporada numa teoria mais geral sobre a carcinogénese química. Do ponto de vista do seu mecanismo de ação, os carcinogénicos são normalmente classificados nas seguintes categorias: (a) Carcinogénicos genotóxicos, para os quais as mutações parecem ser um dos primeiros passos no processo de desenvolvimento do cancro. Tal como referido anteriormente, uma correlação mais convincente com a carcinogenicidade é apenas a relativa aos carcinogénicos que reagem com o DNA. (b) Carcinogénicos não genotóxicos ou carcinogénicos epigenéticos, que não se ligam ao DNA através de ligações covalentes, não causam danos diretos ao DNA e são geralmente negativos nos ensaios padrão de mutagenicidade. Enquanto os carcinogénicos não genotóxicos atuam geralmente através de grande variedade de mecanismos específicos sem nenhum conceito unificador aparente, os carcinogénicos genotóxicos (mais precisamente os carcinogénicos que reagem com o DNA) possuem características comuns e são eletrófilos por si, ou podem ser ativados ou transformados em produtos intermédios eletrófilos reativos, tal como originalmente previsto por James e Elizabeth Miller <sup>(2)</sup>.

É conhecido um vasto número de grupos funcionais que sofre bioativação ou biotransformação. Estes grupos nem sempre podem ser evitados no *design* de novas substâncias ativas ou novos fármacos, no entanto o risco de bioativação pode ser

minimizado usando diversas estratégias como por exemplo: (a) a substituição do grupo funcional suspeito, (b) o bloqueio do metabolismo, (c) tornando o metabolismo menos favorável, e (d) introduzindo mudanças para pontos fracos do metabolismo, de modo a facilitar o metabolismo longe dos substituintes com alertas estruturais. A combinação de estratégias também pode ajudar a melhorar os resultados<sup>(15)</sup>.

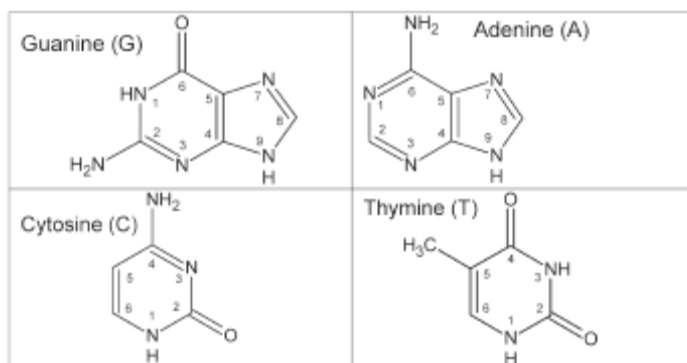
### 3. Mecanismos de ação das substâncias químicas carcinogênicas e mutagênicas: perspectiva geral.

#### 3.1. Carcinogêneos genotóxicos (reagem com o DNA)

O primeiro passo necessário tanto para a atividade carcinogênica como mutagênica dos carcinogênicos genotóxicos é a sua interação com o DNA, tanto diretamente como após a sua ativação. Segundo a teoria de James e Elizabeth Miller, os locais que podem reagir com agentes eletrófilos são os centros nucleófilos do DNA: átomos de azoto e oxigênio das bases purínicas e pirimidínicas e o esqueleto fosfodiéster<sup>(2)</sup>.

Para além da formação de aductos num único local numa base nucleica, os agentes bifuncionais podem reagir com outro local nucleofílico (i) na mesma base nucleica, formando um sistema bicíclico ou tricíclico, (ii) numa base nucleica diferente dentro da mesma cadeia ou em cadeias opostas do DNA, formando ligações inter ou intracadeias, respetivamente, ou (iii) numa proteína, formando ligações cruzadas entre o DNA e a proteína<sup>(2)</sup>.

A figura seguinte representa a numeração dos átomos das bases do DNA de modo a facilitar a compreensão dos mecanismos de ação explicados a seguir<sup>(2)</sup>.



**Figura 2** – Numeração dos átomos das bases do DNA.



Além da natureza química das espécies reativas, a especificidade das reações em diferentes locais é fortemente dependente da nucleofilia dos centros do DNA e dos fatores estéricos. Os locais mais nucleófilos são os nitrogénios endocíclicos tais como N3 e N7 da guanina e da adenina, enquanto os oxigénios exocíclicos das bases são menos nucleófilos. O N7 da guanina, exposto no maior sulco da hélice normal do DNA, é mais acessível e por isso mais disponível para reagir com eletrófilos do que a posição N3 da adenina, orientada para o sulco menor. Por razões semelhantes, locais muito eletrofílicos como N1 da adenina e N3 da citosina, não reagem extensivamente devido ao impedimento estérico. Além de aductos nos nitrogénios e nos oxigénios, foram ainda detetados outros aductos. Por exemplo, apesar da sua fraca nucleofilia, são também frequentemente encontrados aductos na posição C8 da guanina (por exemplo no caso de reações com metabolitos reativos das aminas aromáticas). Contudo, existem evidências que sugerem a formação desses aductos da guanina envolvendo um ataque inicial da posição N7, seguido de rearranjo <sup>(2)</sup>.

Neste panorama geral, a carcinogénese química é altamente diferenciada em termos das vias de formação dos aductos do DNA <sup>(2)</sup>.

Os agentes alquilantes são substâncias químicas capazes, por si, ou após ativação metabólica, de transferir resíduos alquílicos para o DNA, os quais podem conter estruturas complexas incluindo sistemas aromáticos não conjugados com o local de substituição. A posição N7 da guanina é o local mais extensamente modificado por agentes alquilantes. As preferências observadas noutros locais têm sido explicadas em termos de reatividade, forte ou fraca. Os agentes fortemente alquilantes, caracterizados por terem um tamanho pequeno, carga positiva e reduzida capacidade de polarização, possuem elevada reatividade com os oxigénios fortemente nucleófilos do DNA. Por outro lado, agentes alquilantes fracos, de tamanho grande, sem carga e polarizáveis, favorecem reações nos nitrogénios mais fracos. Surpreendentemente, os grupos amina exocíclicos não são alvo de agentes alquilantes <sup>(2)</sup>.

Outra classe de substâncias químicas carcinogénicas é constituída pelos agentes acilantes. As substâncias deste grupo reagem através da transferência do grupo acilo para as bases nucleicas do DNA. Formam aductos na posição O6 da guanina e nos grupos amina exocíclicos da citosina, adenina e guanina <sup>(2)</sup>.

Outra via possível para os locais de substituição é a dos agentes arilaminantes (isto é, aminas e amidas aromáticas, azoaminas e nitroaromáticos): são ativados em espécies muito

eletrofílicas que reagem com o DNA para dar derivados de arilaminas. A maior classe de aductos de DNA originados por estes compostos, formam-se nos átomos N2 e C8 da guanina. Enquanto os aductos N2-guanil podem ser facilmente explicados em termos de reação eletrofílica do ião nitrénio ativado (ou do seu carbénio equivalente), os mecanismos de reação em C8 são menos claros. Esta posição é de facto um local que favorece certas reações de adição de radicais, mas não reage prontamente com outras espécies eletrofílicas. Foi proposto um mecanismo que envolve a formação inicial de um aducto N7-guanil<sup>(2)</sup>.

Outro modo de interação das substâncias químicas com o DNA é através da inserção intercalante no espaço entre pares de bases adjacentes<sup>(2)</sup>.

A intercalação é uma associação não covalente, cuja afinidade é orientada pela força eletrostática, isto é, através de ligações de hidrogénio, de interações de carga transferida e interações de *van der Waals*. As moléculas policíclicas aromáticas são agentes intercalantes clássicos, capazes de se inserirem parcial ou completamente entre pares de bases do DNA adjacentes. Além disso, a atividade intercalante no DNA foi documentada para diversas moléculas com estrutura de múltiplos anéis não fundidos<sup>(2)</sup>.

As potenciais consequências da intercalação compreendem alterações na estrutura local do DNA, incluindo desenrolamento da dupla hélice e alongamento das cadeias danificadas do DNA, quebra das cadeias, através do envenenamento da topoisomerase e mutagenese de enquadramento em bactérias (especialmente nas sequências repetitivas do DNA)<sup>(2)</sup>.

Contudo, as intercalações puras no DNA na ausência de adições ou ligações fortes não geram necessariamente genotoxicidade<sup>(2)</sup>.

Um grande número de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) causam a formação de lesões de DNA volumosos, por ligações covalentes, após ativação metabólica em diol epóxidos altamente reativos. Um fator crucial para a produção, pelos diol epóxidos, de aductos covalentes no DNA, depende da sua capacidade para formar com o DNA, no primeiro passo, complexos intercalantes não covalentes. Ao contrário de outros agentes, os PAH diol epóxidos reagem primeiro com grupos amina exocíclicos da desoxiadenosina e desoxiguanosina. A extensão relativa dos aductos dos dois nucleósidos de purina depende da estrutura química do PAH<sup>(2)</sup>.

Os aductos formados por substâncias químicas reativas para o DNA estão sujeitos a uma variedade de processos de reparação na célula. A reparação ineficiente pode resultar em mutações nas sequências, durante a replicação do DNA. Os diferentes locais de formação de aductos têm sido associados a diferentes probabilidades de causar erros na codificação. A formação de aductos em locais de codificação, tais como O<sup>6</sup>, N1 e N<sup>2</sup> da guanina, N1 e N6 da adenina, O2, N3 e N<sup>4</sup> da citosina e O<sup>4</sup> e N3 da timina, podem ser classificados como lesões promutagénicas, porque se não forem reparadas com sucesso podem interferir com o emparelhamento das bases durante a replicação do DNA e causar mutação. Em contraste, a formação de aductos na posição N7 da guanina e adenina e na posição N3 da adenina geram aductos menos estáveis do que a despurinação espontânea, produzindo reparação eficiente dos locais apurínicos. As grandes lesões em N7, tais como as provocadas por aflotoxinas, podem ter atividade biológica potente, incluindo mutagenicidade e constituem uma exceção a este mecanismo <sup>(2)</sup>.

Para além dos aductos formados nos locais de codificação, os aductos que alteram a estrutura do DNA ou impedem a replicação podem também originar efeitos genotóxicos. É o caso de vários aductos do DNA derivados de carcinogénicos aromáticos volumosos que induzem mutações por alterações conformacionais do DNA <sup>(2)</sup>.

### **3.2. Carcinogénicos não genotóxicos**

Como referido anteriormente os carcinogénicos não genotóxicos atuam por vários mecanismos, sem um conceito unificador aparente. O resumo dos principais mecanismos de carcinogenicidade não genotóxica foi descrito num artigo de revisão de Romualdo Benigni e Cecilia Bossa, publicado em 2011 <sup>(2)</sup>.

Os proliferadores de peroxissoma (PPs) são uma classe de compostos químicos que causam cancro no fígado quando administrados cronicamente em ratos e murganhos. Estes compostos químicos, considerados agentes não genotóxicos, dão geralmente resultados negativos em ensaios de genotoxicidade. O mecanismo pelo qual estes compostos causam tumores não está completamente esclarecido, no entanto, pensa-se que os recetores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa, conhecidos por PPAR $\alpha$  medeiam a maior parte dos efeitos dos PPs no fígado dos roedores <sup>(2)</sup>.

Têm sido propostas duas hipóteses para contabilizar a hepatocarcinogénese induzida por PPs em roedores: (a) aumento nos danos do DNA através da indução de stress oxidativo e (b)

alteração no controlo do crescimento dos hepatócitos pelo aumento da proliferação de células ou diminuição da apoptose. Apesar dos PPs apresentarem geralmente uma estrutura diversa, podem ser identificadas três classes às quais muitos deles pertencem: (1) derivados fenoxiácidos, (2) ácidos alquilcarboxílicos e precursores e (3) ésteres de ftalatos<sup>(2)</sup>.

Tem sido demonstrado que entre os PPs, os ácidos gordos perfluorados com cadeias de comprimento específico exercem uma regulação negativa das comunicações intercelulares via junções do tipo gap (GJIC). A presença de GJIC alteradas tem sido associada a um crescimento e desenvolvimento celular anormais e tem sido implicada no mecanismo de ação de carcinogéneos não genotóxicos<sup>(2)</sup>.

Muitos carcinogéneos não genotóxicos exibem uma inibição ou redução das GJIC. Entre eles estão o clordano, o DDT, o pentaclorofenol, o fenobarbital, os bifenilos polibromados, o hidroxi-anisole butilado, a acetamida, a fenitoína, o mirex e os compostos de níquel e de arsénio<sup>(2)</sup>.

A citotoxicidade é outro mecanismo associado aos carcinogéneos não genotóxicos. Doses elevadas de agentes citotóxicos podem induzir um estado de hiperproliferação nos tecidos alvo, caracterizado pela morte celular e por uma proliferação celular regenerativa compensatória. A proliferação celular persistente, por sua vez, pode ser responsável pelo desenvolvimento de neoplasia. Pensa-se que a citoletalidade, com conseqüente inflamação, hiperplasia regenerativa, ou modulação da resposta imunitária seja um passo necessário para conduzir o processo de carcinogénese pelos carcinogéneos citotóxicos. Como exemplo, o desenvolvimento de tumor no fígado de rato, induzido pelo clorofórmio, mostrou ser secundário a eventos associados à citotoxicidade contínua e conseqüente proliferação celular regenerativa<sup>(2)</sup>.

Verificou-se que alguns compostos químicos não genotóxicos que atuam por um modo de ação citotóxico originam tumores da bexiga ou hiperplasia pela formação de pedras na bexiga, cálculos ou microcristais. Como exemplos são referidos os precipitados urinários e microcristais na bexiga do rato induzidos pela sacarina e os cálculos urinários e pedras da bexiga produzidos pelo uracilo, melanina e ácido tereftálico<sup>(2)</sup>.

A ligação às  $\alpha_{2u}$ -globulinas foi reportada como sendo outro mecanismo citotóxico pelo qual muitos compostos químicos de diversas estruturas induzem tumores do rim em ratos

macho. Substâncias como a gasolina sem chumbo, o trimetilpentano, o D-limoneno, o penta e o hexacloroetano são capazes de se ligar diretamente ou após metabolismo à proteína  $\alpha_{2\mu}$ -globulina, presente em grandes quantidades nos ratos macho de certas espécies. O complexo resultante não é facilmente digerido pela célula. A consequente acumulação de  $\alpha_{2\mu}$ -globulina foi associada a toxicidade, necrose das células do epitélio tubular, com sustentada proliferação regenerativa das células, induzindo por fim tumores no túbulo renal<sup>(2)</sup>.

A imunossupressão pode ser outro evento crucial na indução de cancro pelos carcinogêneos genotóxicos. As terapias imunodepressoras estão muitas vezes associadas a elevada incidência de desenvolvimento de doenças malignas. O papel dos fármacos imunossupressores durante os primeiros passos da formação do tumor permanece controverso. Contudo, pensa-se que a vigilância imunitária diminuída das células neoplásicas e a atividade antiviral deprimida estejam envolvidas na progressão e disseminação do cancro. Um mecanismo celular autónomo independente da imunidade do hospedeiro foi reportado para a promoção do cancro por um imunossupressor muito usado, a ciclosporina A<sup>(2)</sup>.

Outra classe de carcinogêneos não genotóxicos atua através da indução de um desequilíbrio hormonal e subsequente sobreprodução de hormonas tróficas. O aumento persistente dos níveis hormonais estimula a proliferação celular e eventualmente o desenvolvimento de tumores. A exposição longa a hormonas estrogénicas tem sido associada ao aumento do risco de cancro dos tecidos sensíveis a hormonas (mama, endométrio). O mecanismo principal do seu efeito carcinogénico é a proliferação celular através da mediação de sinal do recetor nuclear de estrogénio. Os efeitos do estrogénio genotóxico, através da ativação metabólica do citocromo P450 são considerados uma via complementar importante na sua carcinogenicidade. Os metabolitos eletrofílicos reativos gerados são capazes de formar aductos diretamente com o DNA ou induzir danos oxidativos por processos de ciclo redox e produção de espécies reativas de oxigénio (ROS)<sup>(2)</sup>.

Distúrbios hormonais induzidos por fármacos em roedores demonstraram causar efeitos tumorigénicos na tiroide. Diferentes mecanismos não genotóxicos podem estar envolvidos: perturbações na biossíntese (por exemplo no perclorato e na tioureia) ou secreção (por exemplo no lítio) das hormonas da tiroide; aumento do metabolismo periférico das hormonas da tiroide por indução das enzimas microssomais da tiroide (por exemplo no fenobarbital, clordano, DDT, TCDD e PCB); aumento da secreção da hormona estimulante

da tiroide (TSH), por via da inibição da enzima 5'-monodeionidase (por exemplo no FD&C n°3 e na difeniltiohidantoina) <sup>(2)</sup>.

Associado ao desequilíbrio hormonal, verificou-se que os agentes que induzem desenvolvimento de tumores na tiroide provocam hipersecreção crónica de TSH, que progride para hipertrofia da célula folicular, hiperplasia e eventualmente neoplasia. Os carcinogéneos da tiroide são geralmente diversos na sua estrutura química. Contudo, verificou-se que a presença do elemento estrutural tioamida aumenta o potencial carcinogénico na tiroide, embora não suficiente para gerar tal atividade por si <sup>(2)</sup>.

O stress oxidativo é outro mecanismo possível de funcionamento dos carcinogéneos não genotóxicos. Este resulta de um desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante da célula alvo. As espécies reativas de oxigénio podem interagir com componentes celulares críticos como as proteínas, os lípidos e o DNA. Foi também demonstrado que interferem com as vias de transdução de sinal e regulam a expressão de genes. Estes efeitos epigenéticos são considerados importantes, principalmente na fase carcinogénica de promoção do tumor, em que os danos oxidativos do DNA contribuem predominantemente para o processo de iniciação <sup>(2)</sup>.

O processo de carcinogénese tem sido frequentemente associado a um perfil de metilação do DNA alterado. A metilação do DNA (conteúdo em 5-metilcitosina presente no DNA), é um mecanismo epigenético envolvido na regulação da transcrição. Pensa-se que a alteração dos padrões de metilação, observada em células e tecidos tumorais, interfere com a expressão genética. Pensa-se ainda que a hipermetilação do DNA ou a hipometilação de regiões promotoras, que conduz, respetivamente, à supressão dos supressores do tumor, ou à sobre expressão de oncogenes, desempenha um papel na carcinogénese. Além disso, o aumento da metilação do DNA aumenta a probabilidade dos pontos de mutação C e T, devido a desaminação espontânea da 5-metilcitosina para timina <sup>(2)</sup>.

A tabela seguinte refere uma compilação de classes químicas com reconhecida ligação mecanística à carcinogenicidade e mutagenicidade, codificadas como alertas estruturais no sistema informático especializado Toxtree 2.1.0 (com os códigos Toxtree). As classes estão agrupadas por mecanismos de ação <sup>(2)</sup>.

O Toxtree é um *software* livre que classifica as substâncias químicas e prevê vários tipos de efeitos tóxicos através da aplicação de várias árvores de decisão <sup>(2)</sup>.

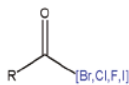
**Tabela I** – Estruturas de alerta de carcinogenicidade e mecanismos de ação.

	<b>Acylating, Direct Acting Agents</b>
SA_1	acyl halides
SA_15	isocyanate and isothiocyanate groups
SA_6	$\beta$ -lactones (and $\gamma$ -sultones)
	<b>Alkylating, Direct Acting Agents</b>
SA_2	alkyl (C < 5) or benzyl ester of sulfuric, sulfonic, phosphoric, or phosphonic acid
SA_3	N-methylol derivatives
SA_5	S or N mustard
SA_6	$\beta$ -lactones and $\gamma$ -sultones
SA_7	epoxides and aziridines
SA_8	aliphatic halogens
SA_9	alkyl nitrite
SA_10	$\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyls
SA_11	simple aldehyde
SA_12	quinones
	<b>Alkylating, Indirect Acting Agents</b>
SA_4	monohaloalkene
SA_13	hydrazine
SA_14	aliphatic azo and azoxy
SA_16	alkyl carbamate and thiocarbamate
SA_21	alkyl and aryl N-nitroso groups
SA_22	azide and triazene groups
SA_23	aliphatic N-nitro group
SA_24	$\alpha,\beta$ -unsaturated aliphatic alkoxy group
	<b>Intercalating and DNA Adduct Forming, Indirect Acting Agents</b>
SA_18	polycyclic aromatic hydrocarbons
SA_19	heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons
SA_30	coumarins and furocoumarins
	<b>Aminoaryl DNA Adducts Forming, Indirect Acting Agents</b>
SA_25	aromatic nitroso group
SA_26	aromatic ring N-oxide
SA_27	nitro-aromatic
SA_28	primary aromatic amine, hydroxyl amine, and its derived esters
SA_28bis	aromatic mono- and dialkylamine
SA_28ter	aromatic N-acyl amine
SA_29	aromatic diazo
	<b>Nongenotoxic Carcinogens</b>
SA_20	(poly) halogenated cycloalkanes
SA_17	thiocarbonyl
SA_31a	halogenated benzene
SA_31b	halogenated PAH
SA_31c	halogenated dibenzodioxins

As características estruturais das classes químicas mencionadas na tabela anterior encontram-se representadas na figura seguinte.

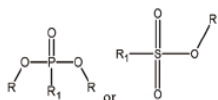
**Acylating, direct acting agents**

SA\_1: Acyl halides

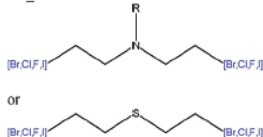


**Alkylating, direct acting agents**

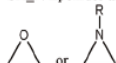
SA\_2: alkyl (C<5) or benzyl ester of sulphonic or phosphonic acid



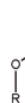
SA\_5: S or N mustard



SA\_7: Epoxides and aziridines



SA\_9: Alkyl nitrite

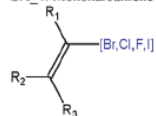


SA\_11: Simple aldehyde

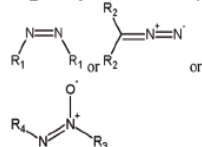


**Alkylating, indirect acting agents**

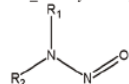
SA\_4: Monohaloalkene



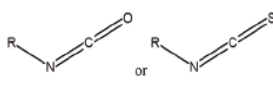
SA\_14: Aliphatic azo and azoxy



SA\_21: alkyl and aryl N-nitroso groups



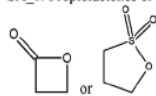
SA\_15: isocyanate and isothiocyanate groups



SA\_3: N-methylol derivatives



SA\_6: Propiolactones or propiolactones



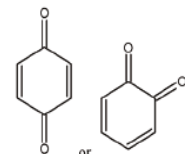
SA\_8: Aliphatic halogens



SA\_10: α, β unsaturated carbonyls



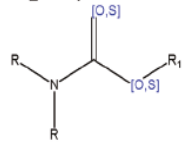
SA\_12: Quinones



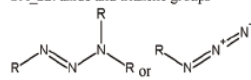
SA\_13: Hydrazine



SA\_16: alkyl carbamate and thiocarbamate

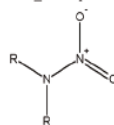


SA\_22: azide and triazene groups

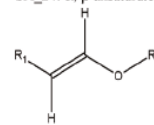


**Alkylating, indirect acting agents**

SA\_25: aliphatic N-nitro group



SA\_24: α, β unsaturated aliphatic alkoxy group

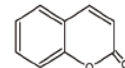


**Intercalating and DNA-adducts forming, indirect acting agents**

SA\_18: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Three or more fused rings, not heteroaromatic

SA\_30: Coumarins and Furocoumarins



SA\_19: Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Three or more fused rings, heteroaromatic

**Aminoaryl DNA-adducts forming, indirect acting agents**

SA\_25: aromatic nitroso group



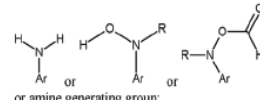
SA\_26: aromatic ring N-oxide



SA\_27: Nitro-aromatic



SA\_28: primary aromatic amine, hydroxyl amine and its derived esters



or amine generating group:



SA\_28bis: Aromatic mono- and dialkylamine



SA\_28ter: aromatic N-acyl amine

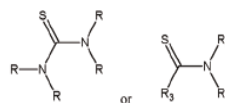


SA\_29: Aromatic diazo



**Nongenotoxic carcinogens**

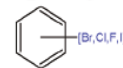
SA\_17: Thiocarbonyl (nongenotoxic)



SA\_20: (Poly) Halogenated Cycloalkanes (nongenotoxic)

Any cycloalkane skeleton with three or more halogens directly bound to the same ring

SA\_31a: Halogenated benzene (nongenotoxic)



SA\_31b: Halogenated PAH (nongenotoxic)



Ar = naphthalene, biphenyl, diphenyl

SA\_31c: Halogenated dibenzodioxins (nongenotoxic)

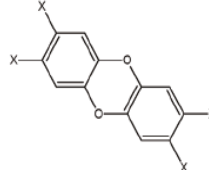


Figura 3 – Características estruturais das classes químicas listadas na tabela 2.



#### **4. Mecanismos de ação e relações estrutura-atividade como base da toxicologia preditiva usada nas tecnologias *in silico*.**

Desde o nascimento da química moderna que os investigadores têm tentado perceber a relação existente entre a estrutura e as bases físico-químicas da atividade biológica das substâncias químicas<sup>(2)</sup>.

Uma das abordagens propostas é a qualitativa, que tem em conta a significância de determinados grupos da molécula na atividade biológica, como por exemplo, grupos descritos como farmacóforos, toxicóforos ou alertas estruturais<sup>(2)</sup>.

A outra é a uma abordagem quantitativa das relações estrutura-atividade (QSAR), desenvolvida nos anos 80. Apesar do aumento exponencial nos métodos e nas tecnologias informáticas propostas, o conhecimento das estruturas de alerta como reconhecimento e classificação de estruturas moleculares e grupos reativos responsáveis pelos efeitos tóxicos, ainda desempenha um papel primário na mecanística da toxicologia e fornece poderosos meios de intervenção para modelar as substâncias químicas. Este facto tem ainda maior importância no campo da carcinogénese e mutagénese, ambos por razões históricas e porque a disponibilidade dos métodos QSAR ainda é limitada. De facto, o conhecimento dos mecanismos de ação tal como exemplificado pelos alertas estruturais (SAs) é usado em rotina no contexto regulamentar na avaliação de risco dos medicamentos e suas impurezas ou na priorização das substâncias químicas a testar em modelos animais. Além disso, os SAs estão na base de programas comerciais, como por exemplo o Derek da Lhasa Ltd, ou não comerciais, como por exemplo o Oncologic e o Toxtree<sup>(2)</sup>.

Existe bastante literatura disponível sobre toxicologia preditiva mas este trabalho foca-se essencialmente na capacidade preditiva da informação qualitativa e quantitativa das relações estrutura-atividade.

Mesmo sabendo que em geral é difícil avaliar as contribuições da informação qualitativa mecanística baseada nas SAR para a avaliação do risco e a modulação das substâncias químicas, existem várias evidências disponíveis indicando que estas contribuições foram importantes. Exemplo disso é o caso do Programa Nacional de Toxicologia dos EUA que seleciona as substâncias químicas a incluir em ensaios toxicológicos. Foi testada a atividade carcinogénica de cerca de 400 substâncias químicas. Dois terços foram selecionados para

ensaios toxicológicos porque apresentavam estruturas suspeitas. Um terço foi selecionado devido às suas características de produção ou exposição. A análise demonstrou que os critérios estruturais adotados para a curta lista de substâncias químicas suspeitas foram capazes de enriquecer o alvo até dez vezes. De facto, verificou-se que 70% das substâncias químicas testadas nos ensaios toxicológicos eram carcinogénicas, enquanto apenas 7% das selecionadas para os ensaios com base nos critérios de produção e exposição eram carcinogénicas<sup>(2)</sup>.

Por outro lado, existem também evidências fornecidas pela Autoridade Reguladora Americana, FDA, de que o número de medicamentos e pesticidas contendo SAs conhecidos ou com resultados positivos no teste de Ames introduzidos recentemente no mercado diminuiu. Este facto indica que a informação mecanística sobre a carcinogenicidade dos compostos químicos é partilhada pelos profissionais responsáveis pelos processos de síntese, o que lhes permite sintetizar produtos mais seguros<sup>(2)</sup>.

Após a definição e compilação dos SAs por parte de John Ashby, com base na teoria eletrofílica de James e Elizabeth Miller, os mais recentes conhecimentos de mecanística sobre substâncias químicas carcinogénicas foram também incorporados em sistemas informáticos especializados que permitem uma avaliação mais rápida e flexível das substâncias químicas. Exemplos de sistemas com acesso livre são o Oncologic e o Toxtree, entre outros mencionados no ponto seguinte deste trabalho<sup>(2)</sup>.

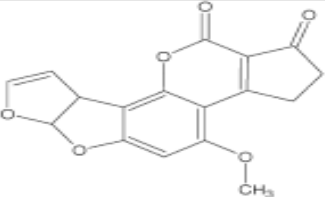
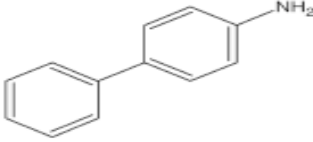

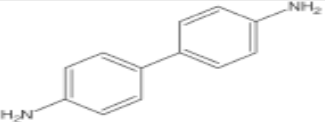
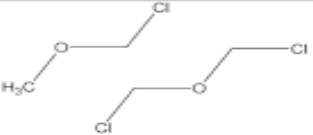


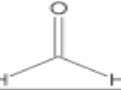
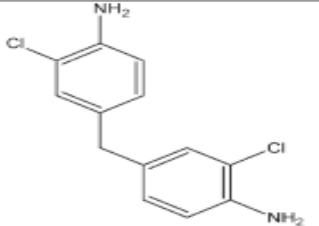
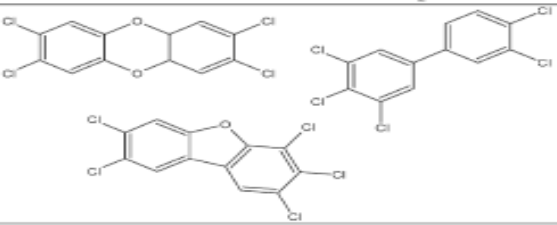
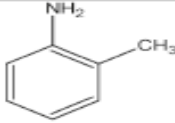

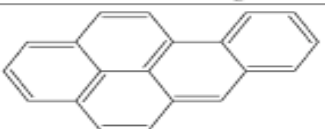
A compilação dos SAs implementados no Toxtree 2.1.0 foi sujeita a estudos de validação: os SAs têm elevada sensibilidade e especificidade para o teste de Ames (exatidão geral = 0.79), mas têm baixa concordância com a carcinogenicidade (exatidão geral = 0.70). A baixa concordância com a carcinogenicidade deve-se ao facto de existirem poucos SAs para os carcinogénicos não genotóxicos. Por outro lado, deve ser enfatizado que a capacidade preditiva dos SAs para a mutagenicidade em *Salmonella* (exatidão = 0.79) é da mesma ordem de grandeza do próprio teste de Ames que apresenta uma reprodutibilidade interlaboratorial de 80-85%. Isto significa que a avaliação da mutagenicidade química através do teste de Ames e através dos SAs tem a mesma fiabilidade<sup>(2)</sup>.

A revisão realizada por Romualdo Benigni e Cecilia Bossa em 2011 refere, sob a forma de tabela, a capacidade preditiva positiva dos SAs de carcinogenicidade do Toxtree, calculada a partir da base de dados livre ISSCAN v3a.

Deve ser realçado que a preditividade positiva média dos SAs é de 80%, o que corresponde a um grau de incerteza semelhante ou mais baixo que o dos ensaios toxicológicos. Os alertas estruturais com elevada preditividade positiva para a carcinogenicidade não pertencem a um mesmo mecanismo toxicológico ou área específica, mas abrangem diferentes categorias e incluem tanto agentes com ação direta como indireta. Deve ser também realçada a elevada preditividade, (a) dos agentes alquilantes, compostos N-nitrosos (SA\_21), quinonas (SA\_12), hidrazinas (SA\_13) e esterés dos ácidos sulfônico ou fosfônico (SA\_2), (b) dos agentes intercalantes, PAH heterocíclicos (SA\_19), e (c) das aminas aromáticas formadoras de aductos com o DNA, arilaminas (SA\_28) <sup>(2)</sup>.

A tabela seguinte constitui outra evidência importante nesta matéria e mostra que quase todas as substâncias reconhecidamente carcinogénicas no Homem contêm SAs. Assim, conclui-se que o conhecimento mecanístico contido nos SAs é uma base adequada para identificar substâncias carcinogénicas para o Homem <sup>(2) (16)</sup>.

**Tabela 2** – Alertas estruturais em compostos reconhecidamente carcinogênicos no Homem.

Human carcinogen	Structure	Structural Alert
Aflatoxins (Aflatoxin B1 showed)		SA_24
4-Aminobiphenyl		SA_28
Benzene		/
Benzidine		SA_28
Dyes metabolized to benzidine		SA_29
Bis(chloromethyl)ether and chloromethyl methyl ether		SA_8
1,3-Butadiene		/
Ethylene oxide		SA_7
Formaldehyde		SA_11
4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)		SA_28
2,3,7,8-TCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, PCB 126		SA_31c, SA_19, SA_31b
<i>o</i> -Toluidine		SA_28
Vinyl chloride		SA_4
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene		SA_18

Deste modo, tendo por base as evidências descritas pode também concluir-se que o grau de incerteza de um modelo QSAR adequado é comparável ao de um ensaio experimental adequado<sup>(2)</sup>.

## 5. Sistemas informáticos especializados ou tecnologias *in silico*

Décadas de pesquisa baseadas na evidência, no espectro das mutações e na sequência genómica dos tumores, permitiram concluir que a mutagenicidade é também indicativo de carcinogenicidade<sup>(14)</sup>.

A disponibilidade de dados experimentais consistentes, sendo o teste de Ames um dos *endpoints* mais usados, levou ao desenvolvimento de muitos sistemas ou modelos *in silico* destinados a prever a mutagenicidade e carcinogenicidade das substâncias químicas<sup>(14)</sup>.

Estes sistemas são ferramentas informáticas úteis para reduzir o tempo, os custos e os recursos gastos nas avaliações e podem ser usados como complemento ou em substituição de dados experimentais nas abordagens baseadas no peso da evidência<sup>(14)</sup>.

### 5.1. Tipos de modelos QSAR

O potencial mutagénico e carcinogénico das substâncias químicas pode ser avaliado por diferentes tipos de modelos QSAR: (a) modelos de SAR qualitativos ou semiquantitativos, (b) modelos QSAR tradicionais, (c) *softwares* ou modelos formais computadorizados e (d) outros métodos baseados em biologia, métodos de modulação molecular ou métodos integrativos<sup>(17)</sup>.

Os modelos de SAR qualitativos ou semiquantitativos envolvem: (a) julgamento humano (*expert judgement*) ou identificação das características estruturais (ou seja, os alertas estruturais) que podem contribuir para a carcinogenicidade com auxílio de computador, (b) avaliação de fatores que afetam a absorção/distribuição/metabolismo/excreção (ADME) e (c) outras informações de suporte como base da previsão. Os resultados da previsão podem ser expressos qualitativamente (positivos ou negativos) ou semiquantitativamente numa escala relativa (baixa, moderada ou elevada). Para substâncias químicas com dados abundantes ou com homólogos ou análogos de estrutura semelhante, podem ser realizadas análises de “*read*

across” ou “*trend analysis*” para projetar o potencial carcinogénico da substância em causa, por comparação com os homólogos ou análogos<sup>(17)</sup>.

Nos modelos QSAR tradicionais o potencial carcinogénico de uma substância química é previsto quantitativamente (geralmente o TD<sub>50</sub> com uma incidência de tumor de 50% em roedores) através da utilização de equações ou modelos matemáticos que relacionam a atividade carcinogénica de um *training set* constituído por substâncias de estrutura semelhante com a combinação das suas propriedades físico-químicas e outros descritores moleculares (topologia, mecânica quântica) usando vários métodos estatísticos tais como análise de regressão e análise do componente principal<sup>(17)</sup>.

Assim, ao longo do tempo foram desenvolvidos vários *softwares* ou modelos de previsão computadorizados para prever o potencial mutagénico e carcinogénico de substâncias químicas. Estes incluem: (a) sistemas baseados em regras do conhecimento especializado que incorporam a experiência humana de peritos, (b) sistemas que combinam as decisões de especialistas com abordagens estatísticas e correlativas, (c) aprendizagem de máquinas, *networking* neuronal, inteligência artificial ou sistemas de mineração de dados para identificar fragmentos moleculares de interesse, descobrir características SAR, deduzir regras de conhecimento e/ou desenvolver decisões lógicas. Também foram usados métodos ou abordagens computacionais para desenvolver: (a) modelos baseados em biologia tais como a modulação 2-D ou 3-D em recetor, *docking* e SAR no ligando, (b) modelos integrativos que incorporam informação química e biológica<sup>(17)</sup>.

Segundo Woo et al., outra forma de classificar os métodos QSAR é a seguinte: (a) métodos baseados em estatística (estatística determinística ou associação probabilística), (b) métodos baseados em mecanística (métodos de modulação no recetor ou baseados em electrofilicidade), ou, (c) métodos que utilizam a combinação das duas abordagens. Idealmente os estudos de QSAR deveriam encontrar uma associação estatística, com fundamentação mecanística<sup>(17)</sup>.

Para o desenvolvimento dos modelos QSAR podem ser usados grupos de compostos químicos (denominados congéneres ou homogéneos) ou grupos de substâncias químicas diversas (denominados não congéneres ou heterogéneos). Em geral, modelos preditivos que usam dados congéneres requerem menos compostos para o desenvolvimento do modelo e têm em geral melhor desempenho (possivelmente porque apresentam maior probabilidade

de terem o mesmo mecanismo) mas são mais limitados no campo de aplicação, enquanto modelos globalmente não congêneres tendem a ser mais versáteis mas mais sujeitos a resultados falsos negativos se o composto químico não estiver bem representado na base de dados <sup>(17)</sup>.

## 5.2. Comparação de modelos QSAR

Tal como referido anteriormente, existem vários programas informáticos livres ou comercializados para previsão da toxicidade utilizando as diferentes abordagens.

Nazanin G. Bakhtyari *et al.* publicaram em 2013 os resultados de um estudo comparativo de modelos *in silico* usados para prever a mutagenicidade de substâncias químicas. Usando uma base de dados com mais de 6000 compostos, este grupo de investigadores testou o desempenho de 8 modelos quantitativos das relações estrutura atividade QSAR: ACD/Tox Suite, Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination, and Toxicity of chemical substances (ADMET) predictor, Derek, Toxicity Estimation Software Tool (T.E.S.T.), TOxicity Prediction by Komputer Assisted Technology (TOPKAT), Toxtree, CEASAR, and SARpy (SAR in python). Para uma avaliação mais realista da exatidão e preditividade foram considerados os resultados obtidos dentro e fora do conjunto de treino (*training set*) de cada modelo <sup>(14)</sup>.

**Tabela 3** – Resumo das características do *software* e respetivas versões usadas.

Software	Method	Freely Available	Applicability Domain
ACD Tox Suite (ACD/Labs v 2.95)	Statistical model employing binominal PLS, predefined set of fragmental descriptors, local correction to baseline, using experimental data for similar compounds	No	Reliability index
ADMET predictor (Simulation Plus v 6.06.0007)	Neural network ensembles	No	Molecular descriptor space
Derek Nexus v 2.0	Collection of knowledge—rule based	No	Not applicable
T.E.S.T. v 4.0.1	Consensus method: average of the predicted toxicity values by 3 models: neural network, Food and Drug Administration, and hierarchical clustering	Yes	Quantitative AD measurement
TOPKAT (Accelrys discovery studio v 3.1)	QSAR statistical method on 2D descriptors (e-state, topological)	No	Optimum predictive space
Toxtree v 2.5.0	Collection of knowledge—rule based	Yes	Not applicable
VEGA Caesar v 2.1.10	QSAR statistical model based on Neural Network + rule-based model	Yes	Quantitative AD measurement
VEGA SARpy v 1.0.5-Beta	Statistical model based on structural alerts automatically selected on the basis of their occurrence in toxic/nontoxic compounds	Yes	Quantitative AD measurement

De acordo com estes investigadores, de um modo geral todos os modelos mostraram elevado desempenho, mas os modelos baseados em métodos estatísticos obtiveram melhores resultados<sup>(14)</sup>.

A preditividade dos modelos QSAR de domínio público para classes individuais de congéneres também foi avaliada numa parceria entre o Instituto *Superiore di Sanita* e o *European Chemicals Bureau*. Os detalhes do estudo foram publicados por Benigni *et al.* em 2008 e testaram a preditividade dos modelos QSAR comparando os resultados com os obtidos num conjunto de testes reais externos. A análise considera seis QSARs que descrevem o gradiente de potência de substâncias tóxicas e cinco QSARs destinados a distinguir compostos ativos e inativos. As atividades biológicas incluem mutagenicidade em *Salmonella* e carcinogenicidade em roedores para as seguintes classes: aminas aromáticas, nitroarenos e aldeídos alifáticos. Os modelos QSAR de potência obtiveram uma preditividade de 30-70% enquanto os modelos QSAR usados para distinguir entre substâncias ativas e inativas obtiveram uma preditividade de 70-100%. Para apreciar plenamente este resultado, a preditividade externa dos modelos de atividade (70-100% de exatidão) deve ser comparada com a variabilidade dos ensaios experimentais. Conforme já referido estima-se que a repetibilidade interlaboratorial de um teste adequado como o teste de Ames seja de 80-85%<sup>(18)</sup>.

De um modo geral, pode concluir-se que um modelo QSAR produz uma avaliação mais refinada relativamente aos SAs e deve ter maior importância numa análise baseada no peso da evidência<sup>(18)</sup>. Além disso, o grau de incerteza de um modelo QSAR adequado é comparável ao de um ensaio experimental adequado<sup>(2)</sup>.

## **6. Aspectos importantes a considerar na utilização de modelos QSAR**

### **6.1. A importância de compreender os mecanismos**

A compreensão dos mecanismos (descritos resumidamente no ponto 3) é crucial na realização da análise QSAR e interpretação dos respetivos resultados, devido ao grau de complexidade, ao elevado número de fatores e à existência de várias fases envolvidas nos processos de carcinogénese<sup>(17)</sup>.



As considerações mecanísticas podem melhorar os estudos ajudando a: (a) selecionar os descritores moleculares mais apropriados (exemplo, electrofilicidade versus análise baseada no recetor), (b) a avaliar se a base de dados de treino é apropriada para as previsões relativas aos compostos a analisar, (c) estratificar a base de dados de treino em grupos mais pequenos, contudo, mais homogéneos do ponto de vista mecanístico, para melhorar a capacidade preditiva, (d) interpretar *outliers*, (e) guiar hipóteses de teste para preencher lacunas nos dados e, (f) avaliar a relevância e significância para o Homem das previsões baseadas em dados obtidos com animais <sup>(17)</sup>.

## 6.2. Critérios para avaliar a validade e o valor científico do modelo QSAR

A maior parte dos estudos de validação tendem a focar-se na exatidão preditiva ou concordância dos métodos QSAR. A exatidão preditiva pode ser separada em dois componentes: (a) sensibilidade, que mede a capacidade de detetar resultados positivos (isto é, evitar falsos negativos), (b) especificidade, que mede a capacidade de prever resultados negativos (isto é, evitar falsos positivos). Deve ser realçado que a exatidão preditiva de cada modelo QSAR é muitas vezes específica do lote de substâncias químicas usado <sup>(17)</sup>.

Para além da exatidão preditiva devem ser considerados outros fatores para avaliar a validade e o valor científico do modelo. Por exemplo para métodos QSAR que envolvam julgamento de peritos (*expert judgment*) os fatores a considerar devem incluir: (a) registos dos conhecimentos e perícias preditivas dos peritos envolvidos, (b) o campo de aplicação e objetivo da análise QSAR, (c) o grau de consideração de literatura de suporte e informação de suporte, (d) o grau de consideração de informação relevante sobre estruturas e mecanismos, e (e) a articulação das bases científicas usadas na previsão, racional, confiança, incerteza e falhas, se existirem <sup>(17)</sup>.

A Organização para a Cooperação Económica e Desenvolvimento (OCDE) realizou um *workshop* em Setúbal para definir os princípios a considerar num modelo QSAR usado por Reguladores. O painel concluiu que, para fins regulamentares, um QSAR deve: (a) estar associado a um *endpoint* definido, com importância regulamentar, (b) tomar a forma de um logaritmo não ambíguo, (c) ter um domínio de aplicação definido, (d) estar associado a bons resultados do grau de ajuste, robustez e preditividade, e (e) ter preferencialmente uma base mecanística <sup>(17)</sup>.

### 6.3. Limitações dos modelos QSAR

Os estudos de QSAR, independentemente da sua adequação têm sempre certas limitações devido às dificuldades inerentes aos *endpoints* específicos. Algumas das maiores dificuldades incluem: (a) complexidade mecanística, que dificulta a análise QSAR; (b) falta de bases de dados de treino bem balanceadas, porque os investigadores tendem a favorecer a condução de estudos com achados positivos em detrimento de outros com resultados negativos; (c) elevada variabilidade de estudos de longo termo com resultados inconsistentes ou inconclusivos que podem requerer mais estudos; (d) espécies, estirpes e géneros diferentes que complicam a interpretação dos resultados e a sua relevância em humanos; (e) o parâmetro quantitativo habitualmente usado ( $TD_{50}$ ) não tem em conta aspetos importantes como a multiplicidade, a malignidade e o período de latência do tumor; (f) complicações devidas ao uso das doses máximas toleradas, muitas vezes usadas em ensaios do cancro; (g) elevados custos de validação externa prospetiva <sup>(17)</sup>.

Para interpretar completamente o *outcome* das previsões QSAR e avaliar a sua fiabilidade, é aconselhado realizar um teste aos modelos QSAR com compostos químicos de atividade conhecida, (a) para assegurar que o modelo possui um bom *training set* e foi devidamente validado, (b) para examinar o racional e os análogos que conduzem às previsões e (c) para verificar os dados dos estudos originais realizados com os análogos chave <sup>(17)</sup>.

### 6.4. Confiança na previsão

A decisão é menos complexa quando existe consenso nas previsões obtidas por dois modelos QSAR. Os resultados discordantes podem muitas vezes ser explicados e conciliados através da aplicação de considerações do conhecimento especializado (*expert knowledge*) <sup>(19)</sup>.

A experiência regulamentar indica que o conhecimento especializado é muitas vezes usado para aumentar a especificidade (ou seja, reduzir os falsos positivos) <sup>(19)</sup>.

A indicação de alertas estruturais com relevância questionável pode originar falsos positivos nas previsões QSAR. Este *outcome* pode estar associado a modelos QSAR baseados em estatística que dependam de medidas de probabilidade sem considerar a relevância da informação usada para a previsão. Alertas baseados em regras de especialistas (*expert rule-*

*based alerts*) com previsões positivas pouco convincentes podem também contribuir para os falsos positivos<sup>(19)</sup>.

Para minimizar o impacto dos falsos positivos as previsões devem ser revistas para determinar a fiabilidade dos alertas identificados. Um alerta estrutural é suficientemente fiável para estabelecer potencial mutagénico se for explicado por um mecanismo plausível. Algumas medidas razoáveis de acompanhamento, quando o mecanismo não é claro, incluem: (a) revisão das moléculas do *training set* com resultados positivos para o teste de Ames para verificar se a reatividade pode ser explicada por características ausentes na impureza, (b) avaliar o número de estruturas do *training set* usadas para produzir o alerta e/ou, (c) avaliar a previsão positiva do alerta. A previsão pode ser abandonada quando as moléculas do *training set* que estiveram na base da previsão contiverem apenas grupos reativos irrelevantes para a impureza em causa<sup>(19)</sup>.

O grau de confiança da previsão também pode diminuir se o modelo QSAR utilizar um *cutoff* estatístico definido ou se for usado um alerta questionável (isto é, um alerta baseado num número mínimo de estruturas, ou seja, com valor preditivo baixo). Embora este critério sozinho não seja suficiente para rejeitar uma previsão positiva, a informação pode contribuir para a tomada de decisão<sup>(19)</sup>.

### 6.5. Fatores de mitigação

Os fatores de mitigação têm impacto na mutagenicidade tipicamente associada à estrutura de alerta. A presença destes fatores pode explicar os resultados experimentais negativos para uma estrutura que aparenta ter potencial mutagénico<sup>(19)</sup>.

De acordo com a forma como exercem o efeito de mitigação, os fatores de mitigação podem ser divididos em 3 categorias: estéricos, eletrónicos e de desintoxicação<sup>(19)</sup>.

Nos modelos QSAR baseados em estatística os fatores de mitigação são derivados das estruturas do *training set* que podem ou não ter impacto conhecido ou suspeito num alerta estrutural específico. A presença de um fator de mitigação pode determinar a exclusão de alerta para sistemas baseados em regras de especialistas (*expert rule-based*), ou numa previsão negativa para sistemas baseados em estatística (*statistically-based*)<sup>(19)</sup>.

Apesar dos fatores de mitigação constituírem considerações importantes para a análise QSAR, devem ser tomadas medidas para que determinadas características irrelevantes não

influenciem indevidamente os resultados finais, originando por exemplo, a mudança de uma previsão positiva para negativa. A mitigação de *outcomes* indesejados pode ser conseguida através da revisão do *training set* para determinar o grau de sobreposição entre as estruturas contendo a estrutura de alerta e as que contêm os fatores de mitigação. A confiança no fator de mitigação pode ser mais facilmente avaliada quando existe sobreposição suficiente. Se a sobreposição for mínima ou inexistente, estabelecer o efeito potencial do fator de mitigação será uma tarefa difícil <sup>(19)</sup>.

### **6.6. Domínio de aplicação ou cobertura**

O conceito de domínio de aplicação (*applicability domain*) é definido em termos práticos como o espaço químico que pode ser previsto com fiabilidade pelo modelo QSAR. O grau máximo de confiança é atingido quando as moléculas se situam no âmbito do domínio de aplicação do modelo QSAR, ou seja, são “cobertas” pelo modelo. A fiabilidade não é garantida para uma estrutura que caia fora do domínio de aplicação do modelo <sup>(19)</sup>.

Os modelos QSAR baseados em estatística geralmente não fazem previsões quando a estrutura a analisar sai do domínio de aplicação. Contudo, é ainda possível obter uma previsão se uma porção da estrutura estiver coberta ou representada no domínio de aplicação. Este é um aspeto muito importante no contexto da avaliação das impurezas, pois é necessário assegurar uma cobertura adequada das estruturas que contêm os grupos funcionais com a reatividade esperada <sup>(19)</sup>.

### **6.7. Utilização da abordagem *read-across***

O *read-across* é uma abordagem para estabelecer o potencial mutagénico, baseada na comparação direta com análogos de estrutura relevante <sup>(19)</sup>. Esta abordagem é indicada na *guideline* ICH M7. De acordo com este documento de orientação, as impurezas que possuem uma estrutura de alerta comum (na mesma posição e no mesmo ambiente químico) à substância ativa ou às substâncias aparentadas com resultados negativos no teste de mutagenicidade bacteriano, devem ser tratadas como não mutagénicas <sup>(20)</sup>.

A avaliação da similaridade pode levantar dificuldades e por esse motivo tem de ser realizada caso a caso <sup>(19)</sup>.

Em circunstâncias raras, os resultados experimentais do teste de Ames obtidos para os análogos estruturais podem justificar a decisão de substituir uma previsão QSAR, servindo

como a única fonte de informação na tentativa de estabelecer o potencial mutagénico. Esta abordagem só é possível quando a análise QSAR não é suficiente para avaliar determinada impureza. Não está definido o número de análogos necessários para justificar uma exclusão<sup>(19)</sup>.

## 7. Processo de avaliação do risco das impurezas

De acordo com a *guideline* ICH M7 a avaliação do risco mutagénico e carcinogénico envolve a análise inicial das impurezas presentes e potenciais através de uma pesquisa de dados de carcinogenicidade e de mutagenicidade bacteriana na literatura e em bases de dados como as referidas na tabela 5, de modo a classificar as impurezas nas classes 1,2 ou 5, descritas na tabela 4<sup>(20) (21) (22)</sup>.

Se os dados para realizar a classificação não estiverem disponíveis deverá ser realizada uma avaliação das relações estrutura-atividade (SAR) focada em previsões de mutagenicidade bacteriana, de modo a obter a classificação das impurezas nas classes 3, 4 ou 5<sup>(20) (21)</sup>.

Deve ser realizada uma avaliação toxicológica computadorizada usando metodologias QSAR que estabeleçam uma previsão do *outcome* de um teste de mutagenicidade bacteriano. Nessa avaliação devem ser aplicadas duas metodologias QSAR complementares, uma baseada em regras de especialistas e outra baseada em estatística. Os modelos QSAR usados devem seguir os princípios gerais de validação da OCDE<sup>(21) (22)</sup>.

Se o resultado das duas metodologias QSAR complementares (*expert rule-based* e *statistically-based*) for a ausência de estruturas de alerta pode concluir-se que as impurezas não levantam preocupações de mutagenicidade e não são necessários mais testes<sup>(20) (21) (22) (23) (24)</sup>.

Se se justificar, o *outcome* de qualquer análise QSAR pode ser revisto à luz do conhecimento especializado (*expert knowledge*) de modo a suportar a evidência da relevância de qualquer resultado positivo, negativo, contraditório ou inconclusivo e fornecer um racional para a conclusão final<sup>(19) (20) (21) (22) (23) (25) (26)</sup>. A figura 4 representa uma árvore de decisão proposta por Mark Powley para utilização do conhecimento especializado em casos de previsões QSAR negativas<sup>(19)</sup>.

Uma impureza com um alerta estrutural que seja comum (mesma alerta estrutural na mesma posição e ambiente químico) à substância ativa ou aos compostos aparentados, pode ser considerada não mutagénica (classe 4 da tabela 4) se o teste de mutagenicidade bacteriana for negativo para esses compostos <sup>(20) (21)</sup>.

**Tabela 4** – Classificação das impurezas relativamente ao seu potencial mutagénico e carcinogénico e respetivas ações de controlo propostas (ICH, 2014).

<b>Classe</b>	<b>Definição</b>	<b>Ação de controlo proposta</b>
<b>1</b>	Carcinogéneos mutagénicos conhecidos	Controlar com um limite igual ou inferior ao limite específico do composto
<b>2</b>	Agentes mutagénicos com potencial carcinogénico desconhecido	Controlar com um limite igual ou inferior ao limite calculado com base no TTC apropriado
<b>3</b>	Estrutura de alerta não relacionada com a substância ativa e sem dados de mutagenicidade	Controlar com um limite igual ou inferior ao limite calculado com base no TTC apropriado ou realizar um teste de mutagenicidade bacteriana  [Teste negativo (composto não mutagénico) = classe 5]  [Teste positivo (composto mutagénico) = classe 2]
<b>4</b>	Estrutura de alerta também presente na substância ativa ou em substâncias aparentados (por exemplo, produtos intermédios do processo de síntese) com resultado negativo num teste de mutagenicidade.	Tratar como impureza não mutagénica
<b>5</b>	Sem estruturas de alerta, ou alertas estruturais com dados suficientes para demonstrar falta de mutagenicidade ou carcinogenicidade	Tratar como impureza não mutagénica

**Tabela 5 – Bases de dados sobre compostos carcinogênicos e mutagênicos (Amberg et al., 2016).**

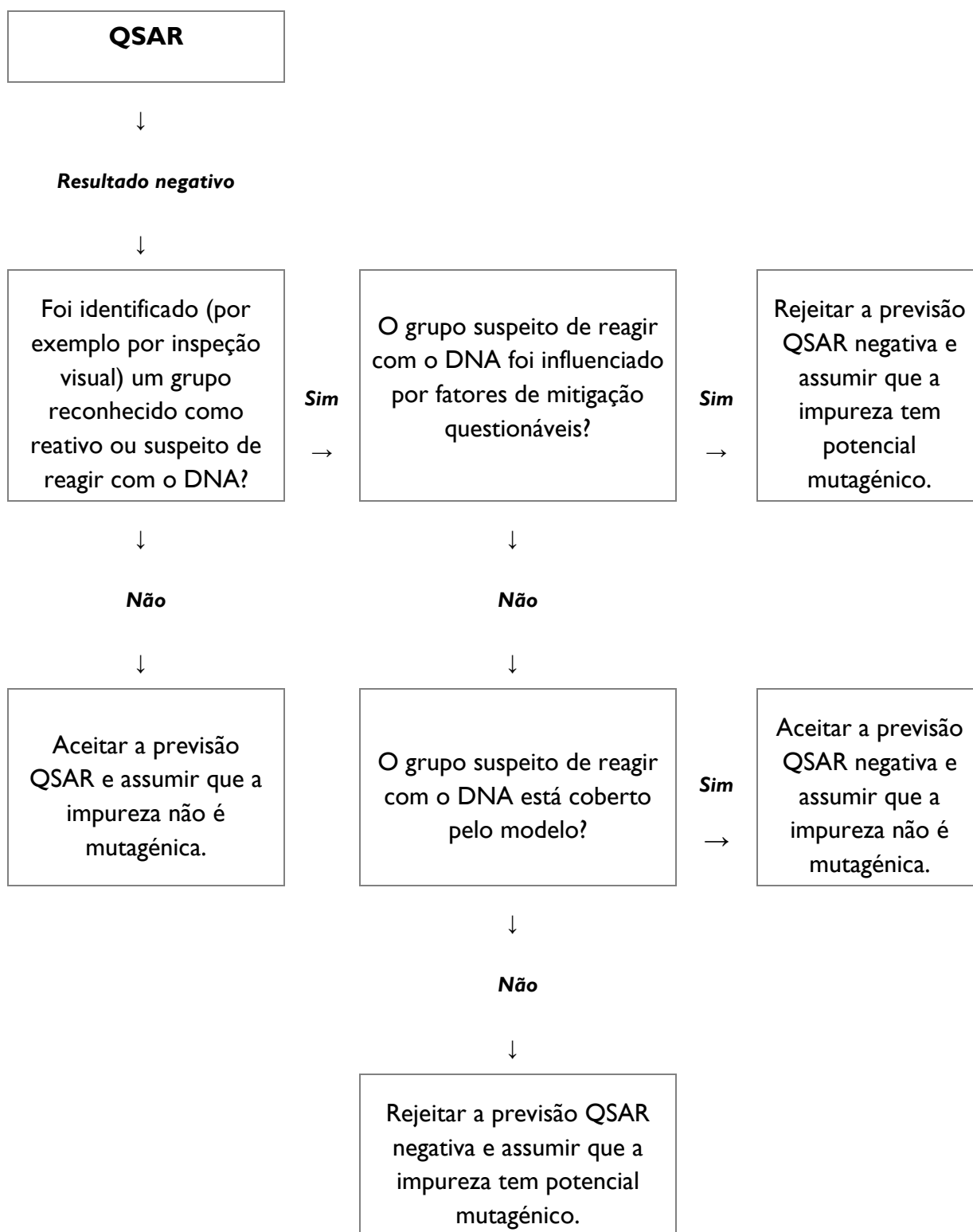
Database	Description	Reference
ATSDR	Open access database from the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) includes toxicological profiles for the hazardous substances including genotoxicity	ATSDR, 2015
CCRIS	Open access database covering chemical carcinogens, including structures and experimental data, covering the period 1985–2011	Young, 2002; CCRIS, 2011
CPDB	Open access Carcinogenicity Potency DataBase covering the period 1980–2011	Gold, 1997, 2001, 2005; CPDB 2011
DSSTox	Open access Distributed Structure-Searchable Toxicity (DSSTox) Database Network including content from other sources (e.g. CPDB, ISSCAN)	DSSTox-Archive, 2012
ECHA	Open access European Chemicals Agency (ECHA) database containing actual data and read across results for chemicals manufactured and imported in Europe	ECHA, 2015
ExPub	Commercial application that includes access to the GENE-TOX and CCRIS databases	ExPub, 2015
GENE-TOX	GENE-TOX provides genetic toxicology (mutagenicity) test data from expert peer review of open scientific literature for more than 3000 chemicals from the United States Environmental Protection Agency (EPA)	GENE-TOX, 1998
IARC	Open access International Agency for Research on Cancer (IARC) monographs including carcinogenicity classification	IARC, 2015
IPSCHEM	Open access International Program on Chemical Safety search for variety of summary documents	INCHEM, 2015
IRIS	Open access data from the EPA in support of human health risk assessment, focusing on hazard identification and dose-response assessment	IRIS, 2015
ISSCAN	Open access database on chemical carcinogens, including structures and experimental data from Istituto Superiore di Sanità	Benigni et al., 2008
JECDB	Open access Japanese Existing Chemical Data Base (JECDB) containing high production volume chemicals	JECDB, 2015
Leadscope	Commercial genetic toxicity and rodent carcinogenicity databases from numerous sources (including US FDA CDER product approval reviews, FDA CFSAN, NTP, CCRIS, and so on) as well as ongoing data harvesting from the literature. Currently includes genetic toxicity data for 11,028 compounds and 179,732 test results and rodent carcinogenicity data for 3598 compounds and 11,538 test results.	Leadscope, 2015
MulticASE	QSAR model training sets containing mutagenicity and rodent carcinogenicity data from public and proprietary sources including the FDA, GENETOX, NTP, CCRIS and IARC.	MulticASE, 2015
NTP	Open access database of National Toxicology Program results	Tennant, 1991; NTP, 2015
PAN	Open access Pesticide Action Network (PAN) Pesticide Database	PAN, 2014
Pharma Pendium	Commercial toxicity data from FDA and EMA approval documents	Pharmapendium, 2015
RTECS	Commercial database available through third parties (e.g. Leadscope) currently containing 10,517 Tumorigenic studies for 3724 compounds and 46,385 Mutation studies for 13,343 compounds	Sweet, 1999; RTECS, 2015
ToxNet/ ChemIDPlus	Open access on-line toxicity search system from the US National Library of Medicine with access to archived versions of CCRIS, GENE-TOX, CPDB	Wexler, 2001; ToxNet, 2015
TRACE from BIBRA	Commercial service for TRACE includes information from peer-reviewed toxicology and nutrition journals as well as secondary sources and websites. In addition to the primary literature on the health effects of chemicals, TRACE covers official publications and evaluations issued by authoritative groups.	Anderson, 2000; BIBRA, 2015; Robinson, 2000
VITIC from Lhasa Limited	Commercial data from published and unpublished sources (15,000 records for carcinogenicity and nearly 95,000 records with mutagenicity Ames data) from a number of sources including IARC Monographs, European Chemicals Bureau (EUB) and NTP.	VITIC, 2015

## 8. Relatório QSAR

Atualmente não existem recomendações regulamentares para o conteúdo dos relatórios QSAR, por esse motivo muitas vezes estes carecem de informação suficiente, especialmente ao nível do conhecimento especializado (*expert knowledge*), o que pode causar atrasos na aprovação de medicamentos, devido a possíveis dúvidas levantadas pelas Autoridades Reguladoras durante a avaliação<sup>(19)</sup>.

No contexto regulamentar o conhecimento especializado é considerado importante na interpretação dos dados e na elaboração das conclusões. Este destina-se a: (a) maximizar a confiança na previsão da análise QSAR, (b) fornecer um racional para suportar a previsão positiva ou negativa da análise QSAR, (c) fornecer uma base para avaliar a mutagenicidade, na ausência de uma previsão QSAR<sup>(19)</sup>.

A figura seguinte representa uma árvore de decisão proposta por Mark Powley para utilização do conhecimento especializado em casos de previsões QSAR negativas <sup>(19)</sup>.



**Figura 4** – Exemplo de árvore de decisão para utilização do conhecimento especializado em casos de previsões QSAR negativas.



É importante que o relatório da análise QSAR aborde fundamentalmente, os materiais e métodos usados na análise, os resultados obtidos e as conclusões. Os dados originais podem ser adicionados em anexo.

### **8.1. Materiais e métodos**

Para assegurar a transparência do processo de avaliação de risco é necessário conhecer os componentes da análise QSAR, assim como o processo de decisão <sup>(19)</sup>.

Deste modo, é importante conhecer os modelos específicos e suas versões, as versões usadas nas bases de dados e no *training set* <sup>(19)</sup>.

Se não forem usados os critérios de aceitação de um modelo disponível comercialmente ou de acesso livre devem ser disponibilizados os dados que suportem os critérios de aceitação propostos (valores de *cutoff* estatístico dos resultados positivos/negativos/indefinidos, a cobertura, etc.) <sup>(19)</sup>.

As estruturas avaliadas pelo modelo QSAR devem ser incluídas no relatório (por exemplo na tabela dos resultados) <sup>(19)</sup>.

A utilização de várias metodologias QSAR pode originar resultados discordantes. É importante que seja definida a base da conclusão integrada <sup>(19)</sup>.

A estratégia mais conservadora é considerar a previsão positiva fiável de qualquer modelo como evidência adequada do potencial mutagénico. Se forem usados outros critérios, o processo de decisão deve ser claramente descrito, incluindo o papel que o conhecimento especializado (se utilizado) ocupa na conclusão integrada final. <sup>(19)</sup>.

### **8.2. Resultados e conclusões**

Esta secção deve incluir uma tabela de resumo ou narrativa que inclua a previsão dos modelos QSAR individuais, uma conclusão integrada e os alertas estruturais que resultem numa previsão positiva. Quando for usado conhecimento especializado para substituir uma previsão QSAR, deve ser discutido o respetivo racional e devem ser apresentados os dados de suporte (por exemplo, estruturas, resultados dos testes de Ames, publicações, etc.). Deve ser apresentada informação adicional quando um grupo suspeito é identificado através de inspeção visual mas não é acompanhado de uma previsão QSAR positiva. Em certos casos o modelo QSAR pode identificar o alerta suspeito e apresentar um resultado negativo

devido a fatores de mitigação presentes na molécula. Nestes casos, tanto os alertas como os fatores de mitigação devem ser descritos. Devido ao elevado número de fatores de mitigação é aconselhável limitar a discussão àqueles que influenciam mais a previsão<sup>(19)</sup>.

Outra situação possível é o grupo reativo suspeito não ser detetado na análise QSAR devido à falta de cobertura. Estas preocupações podem ser minimizadas se for demonstrado que a estrutura preocupante está adequadamente representada no *training set* do modelo QSAR<sup>(19)</sup>.

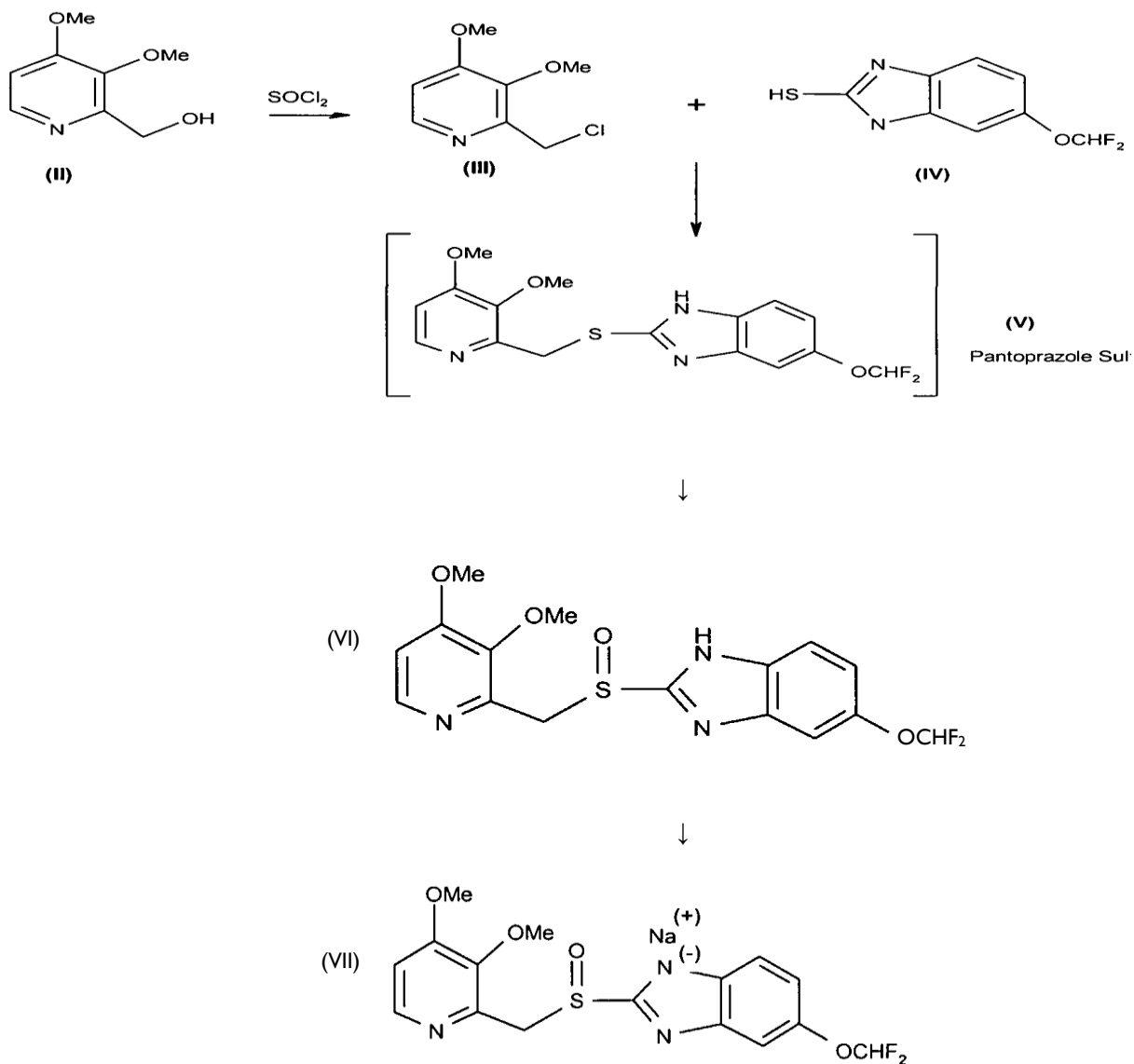
### **8.3. Anexos**

Os dados da análise QSAR podem ser adicionados em anexo para facilitar a sua revisão detalhada. Outras informações para o uso do conhecimento especializado, tais como os relatórios dos testes de Ames e a representação das estruturas, também podem ser incluídas em anexo.

## **9. Estudo de Caso. O exemplo da síntese do pantoprazol sódico.**

Como exemplo de avaliação toxicológica computacional apresentamos a análise *in silico* das potenciais impurezas provenientes de um processo de síntese de pantoprazol sódico, um fármaco inibidor da bomba de prótons.

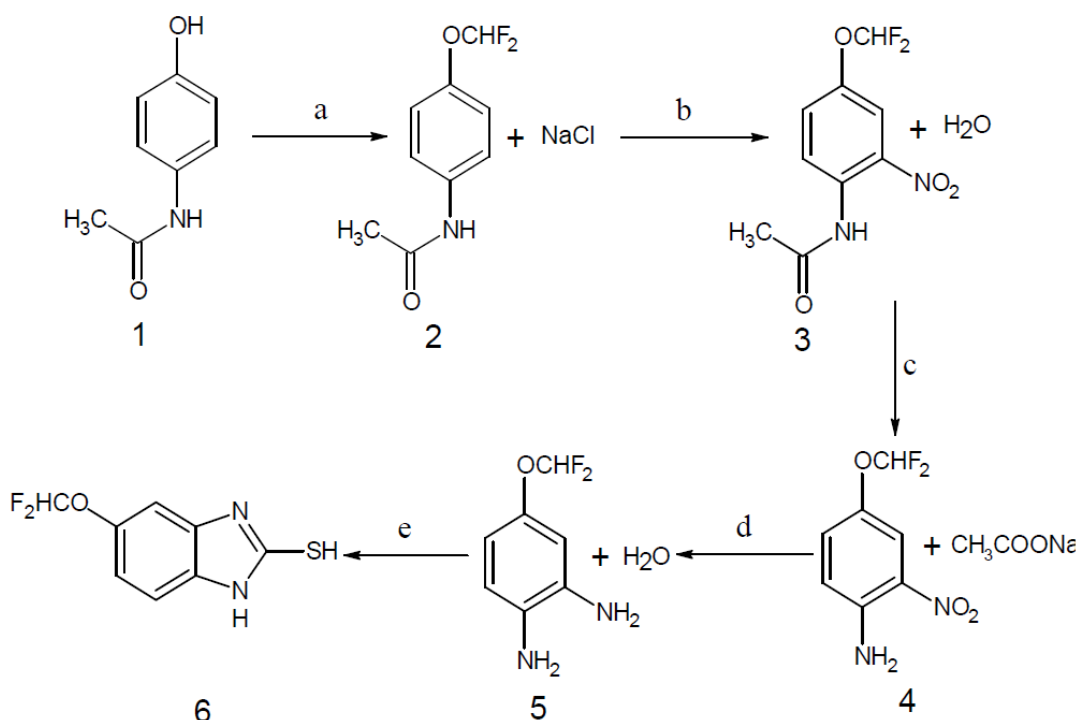
O processo de síntese do pantoprazol sódico, descrito na patente WO2006064249 A2, encontra-se resumido no esquema da figura seguinte<sup>(27)</sup>.



**Legenda:** (II): 2-hidroximetil-3,4-dimetoxipiridina; (III): 2-clorometil 3, 4 dimetoxi piridina; (IV): 2-mercapto-5-difluorometoxi-1H-benzimidazol; (V): pantoprazol sulfureto; (VI): pantoprazol; (VII): pantoprazol sódico.

**Figura 5** – Esquema do processo de síntese do pantoprazol sódico.

Neste trabalho foram ainda consideradas as potenciais impurezas do processo de síntese do material de partida 2-mercapto-5-difluorometoxi-1H-benzimidazol, descrito por Vora *et al.* que se encontra resumido no esquema da figura seguinte <sup>(28)</sup>.



**Legenda:** (1): p-hidroxi acetanilida; (2): N-[4-(difluorometoxi)fenil]acetamida; (3): N-[4-(difluorometoxi)-2-nitrofenil]acetamida; (4): [4-(difluorometoxi)-2-nitrofenil]amina; (5): 4-(difluorometoxi)benzeno-1,2-diamina; (6): 2-mercaptopantoprazol.

**Figura 6** – Esquema do processo de síntese do 2-mercaptopantoprazol.

Foram analisados os processos de síntese acima referidos tendo sido considerados os materiais de partida, reagentes, solventes, produtos intermédios e produtos de reações secundárias.

Para cada substância ou composto foi realizada uma pesquisa da respetiva informação toxicológica na literatura. Os compostos sem dados toxicológicos disponíveis na literatura foram submetidos a análise *in silico*.

Os catalisadores e solventes usados nos processos de síntese, assim como as substâncias aparentadas do pantoprazol sódico (descritas na monografia da Ph. Eur. para o pantoprazol sódico sesqui-hidratado, como impurezas A, B, C, D, E e F) não foram incluídas na análise *in silico*, por terem um perfil toxicológico conhecido que permite a sua classificação conforme previsto na *guideline* ICH M7.

O composto I usado na síntese do 2-mercapto-5-difluorometoxi-1H-benzimidazol é o paracetamol, um fármaco cujo perfil toxicológico é conhecido, pelo que também foi excluído da análise *in silico*.

Para a análise *in silico* foram selecionados programas informáticos que utilizam metodologias complementares (*expert rule-based* e *statistically-based*). A escolha dos programas informáticos recaiu sobre a plataforma VEGA por ser de acesso livre e incorporar diversos modelos QSAR validados.

### 9.1. Software VEGA

Foi usada a versão 1.1.3 do VEGA com os seguintes modelos:

Mutagenicity (Ames test) CONSENSUS model 1.0.1

Mutagenicity (Ames test) model (CAESAR) 2.1.13

Mutagenicity (Ames test) model (SarPy/IRFMN) 1.0.7

Mutagenicity (Ames test) model (ISS) 1.0.2

Mutagenicity (Ames test) model (KNN/Read-Across) 1.0.0

Carcinogenicity model (CAESAR) 2.1.9

Carcinogenicity model (ISS) 1.0.2

Carcinogenicity model (IRFMN/Antares) 1.0.0

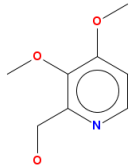
Carcinogenicity model (IRFMN/ISSCAN-CGX) 1.0.0

O *software*, respetivas características e modo de utilização encontram-se disponíveis em: <http://www.vega-qsar.eu/index.php>.

### 9.2 Resultados obtidos com o software VEGA

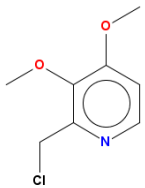
Os resultados obtidos com o *software* VEGA encontram-se resumidos na tabela seguinte.

Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos com o software VEGA.

Compounds	Predictions of Mutagenicity Models					Predictions of Carcinogenicity Models			
	CAESAR	ISS	SarPy / IRFMN	KNN / Read-Across	CONSENSUS	CAESAR	ISS	IRFMN / Antares	IRFMN / ISSCAN-CGX
 <p>2-hydroxymethyl-3,4-dimethoxypyridine</p>	<p><b>NON-Mutagenic*</b> (good reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: NON-Mutagenic</p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>into the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>NON-Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: NON-Mutagenic</p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Possible NON-Mutagenic*</b> (moderate reliability)</p> <p>Experimental value:--</p> <p>Predicted Mutagen activity: Possible NON-Mutagenic</p> <p>No. alerts for mutagenicity: 0</p> <p>No. alerts for non-mutagenicity: 0</p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound <b>could be out of the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>NON-Mutagenic*</b> (moderate reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: NON-Mutagenic</p> <p>Molecules used for prediction: 4</p> <p>Reliability: the predicted compound <b>could be out of the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>NON-Mutagenic*</b> with a consensus score of 0.57, based on 4 models.</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>P(Carcinogen): 0.866</p> <p>P(NON-Carcinogen): 0.134</p> <p>Reliability: the predicted compound <b>could be out of the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>NON-Carcinogen</b></p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Possible NON-Carcinogen</b></p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 0</p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound <b>could be out of the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 1</p> <p>Structural alerts: <b>Carcinogenity alert no. 43</b></p> <p>Reliability: the predicted compound <b>could be out of the Applicability Domain</b> of the model</p>

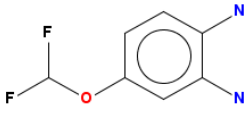
(\*) CONSENSUS final prediction.

Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos com o software VEGA (continuação).

Compounds	Predictions of Mutagenicity Models					Predictions of Carcinogenicity Models			
	CAESAR	ISS	SarPy / IRFMN	KNN / Read-Across	CONSENSUS	CAESAR	ISS	IRFMN / Antares	IRFMN / ISSCAN-CGX
 <p>2-chloromethyl 3,4-dimethoxy pyridine</p>	<p>Suspect Mutagenic* (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Suspect Mutagenic</p> <p>Structural alerts: SA8 Aliphatic halogens</p> <p>Reliability: the predicted compound is outside the Applicability Domain of the model</p>	<p>Mutagenic* (moderate reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>Structural alerts: SA8 Aliphatic halogens</p> <p>Reliability: the predicted compound could be out of the Applicability Domain of the model</p>	<p>Possible NON-Mutagenic* (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Possible NON-Mutagenic</p> <p>No. alerts for mutagenicity: 0</p> <p>No. alerts for non-mutagenicity: 0</p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound is outside the Applicability Domain of the model</p>	<p>Mutagenic* (moderate reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagen</p> <p>Molecules used for prediction: 4</p> <p>Reliability: the predicted compound could be out of the Applicability Domain of the model</p>	<p>Mutagenic* with a consensus score of 0.35, based on 4models.</p>	<p>Carcinogen</p> <p>P(Carcinogen): 0.856</p> <p>P(NON-Carcinogen): 0.144</p> <p>Reliability: the predicted compound is outside the Applicability Domain of the model</p>	<p>Carcinogen</p> <p>Structural alerts: SA8 Aliphatic halogens</p> <p>Reliability: the predicted compound is outside the Applicability Domain of the model</p>	<p>Carcinogen</p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 1</p> <p>Structural alerts: Carcinogenicity alert no. 57</p> <p>Reliability: the predicted compound could be out of the Applicability Domain of the model</p>	<p>Carcinogen</p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 1</p> <p>Structural alerts: Carcinogenicity alert no. 43</p> <p>Reliability: the predicted compound could be out of the Applicability Domain of the model</p>

(\*) CONSENSUS final prediction.

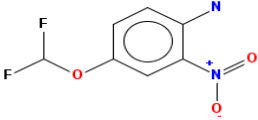
Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos com o software VEGA (continuação).

Compounds	Predictions of Mutagenicity Models					Predictions of Carcinogenicity Models			
	CAESAR	ISS	SarPy / IRFMN	KNN / Read-Across	CONSENSUS	CAESAR	ISS	IRFMN / Antares	IRFMN / ISSCAN-CGX
 <p>4-(difluoromethoxy)benzene-1,2-diamine</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>Structural alerts: SA28 Primary aromatic amine, hydroxyl amine and its derived esters (with restrictions)</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>No. alerts for mutagenicity: 1</p> <p>No. alerts for non-mutagenicity: 0</p> <p>Structural alerts: SM70</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagen</p> <p>Molecules used for prediction: 4</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> with a consensus score of 0.2, based on 4 models.</p>	<p><b>NON-Carcinogen</b></p> <p>P(Carcinogen): 0.497</p> <p>P(NON-Carcinogen): 0.503</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>Structural alerts: SA28 Primary aromatic amine, hydroxyl amine and its derived esters (with restrictions)</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Possible NON-Carcinogen</b></p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 0</p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 2</p> <p>Structural alerts: Carcinogenicity alert no. 35; Carcinogenicity alert no. 42</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>

(\*) CONSENSUS final prediction.

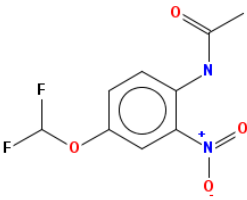


**Tabela 6** – Resumo dos resultados obtidos com o software VEGA (continuação).

Compounds	Predictions of Mutagenicity Models					Predictions of Carcinogenicity Models			
	CAESAR	ISS	SarPy / IRFMN	KNN / Read-Across	CONSENSUS	CAESAR	ISS	IRFMN / Antares	IRFMN / ISSCAN-CGX
 <p><b>[4-(difluoromethoxy)-2-nitrophenyl]amine</b></p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>Structural alerts: SA27 Nitro aromatic</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>Structural alerts: SA27 Nitro aromatic; SA28 Primary aromatic amine, hydroxyl amine and its derived esters (with restrictions)</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>No. alerts for mutagenicity: 1</p> <p>No. alerts for non-mutagenicity: 0</p> <p>Structural alerts: SM70</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (moderate reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>Molecules used for prediction: 4</p> <p>Reliability: the predicted compound <b>could be out of the Applicability Domain</b> model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> with a consensus score of 0.3, based on 4 models.</p>	<p><b>NON-Carcinogen</b></p> <p>P(Carcinogen): 0.104</p> <p>P(NON-Carcinogen): 0.896</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>Structural alerts: SA27 Nitro aromatic; SA28 Primary aromatic amine, hydroxyl amine and its derived esters (with restrictions)</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 2</p> <p>Structural alerts: Carcinogenicity alert no. 63; Carcinogenicity alert no. 64</p> <p>Reliability: the predicted compound <b>could be out of the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 2</p> <p>Structural alerts: Carcinogenicity alert no. 35; Carcinogenicity alert no. 42</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>

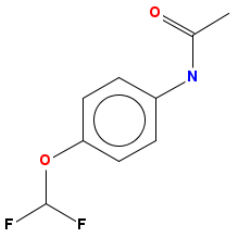
(\*) CONSENSUS final prediction.

**Tabela 6** – Resumo dos resultados obtidos com o software VEGA (continuação).

Compounds	Predictions of Mutagenicity Models					Predictions of Carcinogenicity Models			
	CAESAR	ISS	SarPy / IRFMN	KNN / Read-Across	CONSENSUS	CAESAR	ISS	IRFMN / Antares	IRFMN / ISSCAN-CGX
 <p><b>N-[4-(difluoromethoxy)-2-nitrophenyl] acetamide</b></p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>Structural alerts: SA27 Nitro aromatic</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>Structural alerts: SA27 Nitro aromatic; SA28ter Aromatic N-acyl amine</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>No. alerts for mutagenicity: 1</p> <p>No. alerts for non-mutagenicity: 0</p> <p>Structural alerts: SM70</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (moderate reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagen</p> <p>Molecules used for prediction: 4</p> <p>Reliability: the predicted compound <b>could be out of the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b></p> <p>with a consensus score of 0.3, based on 4 models</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>P(Carcinogen): 0.637</p> <p>P(NON-Carcinogen): 0.363</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>Structural alerts: SA27 Nitro aromatic; SA28ter Aromatic N-acyl amine</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 2</p> <p>Structural alerts: Carcinogen alert no. 63; Carcinogen alert no. 64</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 2</p> <p>Structural alerts: Carcinogen alert no. 35; Carcinogen alert no. 42</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>

(\*) CONSENSUS final prediction.

Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos com o software VEGA (continuação).

Compounds	Predictions of Mutagenicity Models					Predictions of Carcinogenicity Models			
	CAESAR	ISS	SarPy / IRFMN	KNN / Read-Across	CONSENSUS	CAESAR	ISS	IRFMN / Antares	IRFMN / ISSCAN-CGX
 <p><b>N-[4-(difluoromethoxy)phenyl]acetamide</b></p>	<p><b>NON-Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: NON-Mutagenic</p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Mutagenic</p> <p>Structural alerts: SA28ter Aromatic N-acyl amine</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Possible NON-Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: Possible NON-Mutagenic</p> <p>No. alerts for mutagenicity: 0 No. alerts for non-mutagenicity: 0</p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>NON-Mutagenic*</b> (low reliability)</p> <p>Experimental value: -</p> <p>Predicted Mutagen activity: NON-Mutagenic</p> <p>Molecules used for prediction: 4</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>NON-Mutagenic*</b> with a consensus score of 0.15, based on 4 models.</p>	<p><b>NON-Carcinogen</b></p> <p>P(Carcinogen): 0.104</p> <p>P(NON-Carcinogen): 0.896</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>Structural alerts: SA28ter Aromatic N-acyl amine</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Possible NON-Carcinogen</b></p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 0</p> <p>Structural alerts: -</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>	<p><b>Carcinogen</b></p> <p>No. alerts for carcinogenicity: 1</p> <p>Structural alerts: Carcinogenicity alert no. 42</p> <p>Reliability: the predicted compound is <b>outside the Applicability Domain</b> of the model</p>

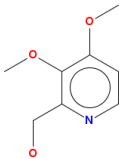
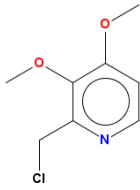
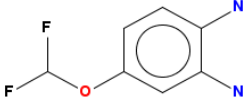
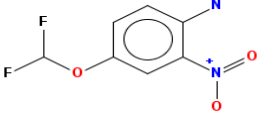
(\*) CONSENSUS final prediction.

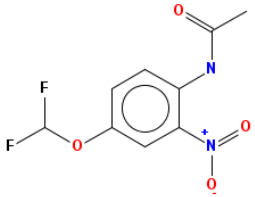
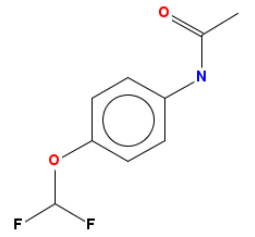
### 9.3 Discussão dos resultados

Com base na análise detalhada dos resultados das previsões QSAR obtidas, interpretadas à luz dos conhecimentos atuais, foi adotado o critério mais conservador para realizar a classificação das impurezas.

A classificação das impurezas submetidas a esta análise *in silico* é indicada na tabela seguinte.

**Tabela 7** – Resumo da discussão dos resultados e conclusão integrada.

Impureza	Conclusão integrada	
	Resumo da discussão dos resultados	Classe
 <p>2-hidroximetil-3,4-dimetoxipiridina</p>	<p>Não foram encontrados SAs de mutagenicidade.</p> <p>Aceita-se a previsão de que o composto não é mutagénico.</p>	5
 <p>2-clorometil 3, 4 dimetoxi piridina</p>	<p>Foi encontrado SA de mutagenicidade (SA8).</p> <p>Aceita-se a previsão de que o composto é mutagénico.</p>	3
 <p>4-(difluorometoxi)benzeno-1,2-diamina</p>	<p>Foram encontrados SAs de mutagenicidade (SA28 e SM70)</p> <p>Aceita-se a previsão de que o composto é mutagénico.</p>	3
 <p>[4-(difluorometoxi)-2-nitrofenil]amina</p>	<p>Foram encontrados SAs de mutagenicidade (SA27, SA28 e SM70).</p> <p>Aceita-se a previsão de que o composto é mutagénico.</p>	3

Impureza	Conclusão integrada	
	Resumo da discussão dos resultados	Classe
 <p>N-[4-(difluorometoxi)-2-nitrofenil] acetamida</p>	<p>Foram encontrados SAs de mutagenicidade (SA27, SA28ter e SM70).                      Aceita-se a previsão de que o composto é mutagénico.</p>	3
 <p>N-[4-(difluorometoxi)fenil]acetamida</p>	<p>A previsão dos vários modelos de mutagenicidade é discordante. Contudo, foi encontrado SA de mutagenicidade (SA28ter).                      Adota-se o critério mais conservador e aceita-se a previsão de que o composto é mutagénico, obtida no modelo SS.</p>	3

**Observação:** Para facilitar o desenho das estruturas dos compostos nos programas informáticos, os átomos de hidrogénio não estão representados nas estruturas.

## Conclusão

A pesquisa sobre mecanismos de carcinogénese das substâncias químicas já tem uma longa história. O cruzamento de diferentes ideias e métodos provenientes de diversos campos científicos deu origem a importantes conquistas, como por exemplo, a racionalização dos mecanismos pelos quais as substâncias químicas reativas para o DNA causam mutações e cancro <sup>(2)</sup>.

O conhecimento científico sobre as estruturas de alerta de toxicidade eventualmente presentes nas substâncias químicas e os efeitos tóxicos a que estas estão associadas, bem como a incorporação desta informação em programas informáticos estudados e validados para prever a genotoxicidade, a mutagenicidade e a carcinogenicidade das substâncias químicas (tecnologias *in silico*), são uma ferramenta fiável e reconhecida pela comunidade científica que se reveste de grande importância, na medida em que permite realizar menos ensaios toxicológicos em animais, economizar tempo e diminuir custos <sup>(29)</sup>.

A utilização contínua desta ferramenta e o desenvolvimento de outras mais inovadoras permitirão o *design* e a síntese de substâncias químicas cada vez mais seguras, com óbvios benefícios para a saúde e para o ambiente.

Contudo, apesar das análises QSAR serem razoavelmente sensíveis e específicas, basear as conclusões da previsão num simples resultado positivo ou negativo pode ser problemático. A chave para melhorar a performance das análises QSAR é integrar também nas conclusões informação de suporte, conhecida como conhecimento especializado (*expert knowledge*). Embora o conhecimento especializado seja subjetivo e esteja associado a grande variabilidade no conteúdo e na qualidade, é ainda um componente crítico na avaliação das impurezas dos medicamentos, pelo que, a sua utilização é encorajada pela *guideline* ICH M7 <sup>(19)</sup>.

Alguns cientistas têm expressado a preocupação de que a abordagem recomendada pela *guideline* ICH M7 de utilização de duas metodologias QSAR complementares, resulte num elevado número de falsos positivos. No contexto da avaliação de impurezas de medicamentos, os resultados falsos positivos conduzem a estratégias de controlo desnecessárias ou ensaios desnecessários para caracterizar a carcinogenicidade. Estes *outcomes* são ambos aceitáveis na medida em que contribuem para garantir a segurança dos doentes <sup>(19)</sup>.

A ocorrência de falsos negativos é uma preocupação mais séria, uma vez que podem conduzir a uma excessiva exposição clínica a substâncias mutagénicas. Outra preocupação adicional é o uso desadequado da análise QSAR para avaliar as impurezas cuja química não esteja adequadamente coberta pelo domínio de aplicação do modelo, o que pode resultar em falsos negativos. A chave para melhorar as avaliações da mutagenicidade é considerar boas previsões QSAR, complementadas por informação de suporte, referida na *guideline* ICH M7 como conhecimento especializado <sup>(19)</sup>.

Por fim, importa realçar que o processo de avaliação do potencial mutagénico das impurezas de fármacos deve ponderar de forma adequada e fazer um balanço equilibrado de modo a, por um lado, evitar ações regulatórias desnecessárias devido a falsos positivos, e, por outro lado, maximizar a segurança dos doentes <sup>(19)</sup>.

A escolha de modelos *in silico*, validados e robustos, assim como o conhecimento do seu funcionamento, respetivos domínios de aplicação e *training set*, são fundamentais para a obtenção de resultado fiáveis.

Conforme referido, a utilização do conhecimento especializado é considerado um fator chave para a interpretação dos resultados e para a elaboração das respetivas conclusões integradas. Assim, a correta utilização das tecnologias *in silico* requer não apenas conhecimentos gerais de química e toxicologia, mas também o conhecimento das estruturas de alerta, bem como a compreensão dos mecanismos que estão na base da genotoxicidade e da carcinogénese.

Por outro lado, é importante assegurar a atualização constante dos modelos QSAR com os mais recentes dados toxicológicos obtidos *in vitro* e *in vivo*.

Do ponto de vista regulamentar seria útil, numa perspetiva futura, a existência de normas orientadoras relativamente ao conteúdo dos relatórios das análises *in silico*. A instrução dos processos com informação transparente, robusta e consistente, facilitaria a avaliação do benefício-risco dos medicamentos, contribuindo deste modo para decisões mais céleres por parte das Autoridades Reguladoras, com inerentes vantagens para a Indústria Farmacêutica e para os doentes.

## Bibliografia

1. EMA/CHMP/ICH. ICH guideline M7 on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. London : s.n., May 2013.
2. Benigni, Romualdo e Bossa, Cecilia. Mechanisms of Chemical Carcinogenicity and Mutagenicity: A Review with Implications for Predictive Toxicology. Chemical Reviews. Rome : American Chemical Society Publications, January 2011.
3. ICH, Expert Working Group. Guidance on Genotoxicity Testing And Data Interpretation For Pharmaceuticals Intended For Human Use, S2(R1). International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. 9 de November de 2011.
4. Farmacopeia Portuguesa. 9ª Edição. 2009.
5. EMEA/CHMP/QWP. Guideline on the limits of genotoxic impurities, CPMP/SWP/5199/02, EMEA/CHMP/QWP/251344/2006. London : s.n., 28 de June de 2006.
6. EMA/CPMP/ICH. Note for Guidance on Impurities Testing: Impurities in New Drug Substances (ICH Q3A (R2)). CPMP/ICH/2737/99-ICH Q3A (R2). London : s.n., October de 2006.
7. EMA/CPMP/QWP. Guideline on control of impurities of Pharmacopoeial substances: compliance with the European Pharmacopoeia General Monograph "Substances for Pharmaceutical Use" and general chapter "control of impurities in substances for pharmaceutical UCPMP/QWP/1529/04. CPMP/QWP/1529/04. London : s.n., 22 de April de 2004.
8. Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de Agosto, Estatuto do Medicamento. Diário da República, 1ª série. 30 de Agosto de 2006. Vol. 167.
9. Sushko, Iurii, et al. ToxAlerts: A Web Server of Structural Alerts for Toxic Chemicals and Compounds with Potential Adverse Reactions. Journal of Chemical Information and Modeling . s.l. : ACS Publications, August 2012.
10. EMEA/CPMP/ICH. ICH Q3C(R4) Impurities: Guideline for residual solvents, CPMP/ICH/283/95. February. London : s.n., 2009.



11. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. Muller, Lutz e all, et. 2006, Regulatory Toxicology and Pharmacology, Vol. 44, 198-211.
12. Recent developments in the risk assessment of potentially genotoxic impurities in pharmaceutical drug substances. Humfrey, Charles D. N. UK : s.n., 30 de June de 2007, Toxicological Sciences, Vol. 100 (1), 24-28.
13. Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities. Liu, David Q., SUN, Mingjiang e Kord, Alireza S. USA : s.n., 2010, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 51, 999-1014.
14. Bakhtyari, Nazanin G., et al. Comparison of In Silico Models for Prediction of Mutagenicity. Journal of Environmental Science and Health. London : s.n., 2013.
15. Walsh, Jonh S. e Miwa, Gerald T. Bioactivation of Drugs: Risk and Drug Design. Annual Review Pharmacology Toxicology. California : s.n., 2011.
16. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. Escobar, P.A., et al. Mutation Research., s.l. : Mutation Research/Reviews in Mutation Research., 2012, Vols. 752 (2013) 99-118.
17. Woo, Yin-tak e Lai, David Y. Methods for informing cancer risk quantification. 2010.
18. Benigni, Romualdo, et al. The Benigni/ Bossa rulebase for mutagenicity and carcinogenicity - a module of Toxtree. JRC Scientific and Technical Reports. Luxembourg : Office for Official Publications of the European Communities, 2008.
19. (Q)SAR assessments of potentially mutagenic impurities: A regulatory perspective on the utility of expert knowledge and data submission. . Powley, Mark W. Regulatory Toxicology and Pharmacology, United States : Elsevier, 2015, Vol. 71.
20. M7. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. ICH. s.l. : ICH, 2014. Step 4.
21. Addendum to ICH M7: Assessment and control of DNA. ICH. 2015.
22. Principles and procedures for implementation of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. Amberg, Alexander, et al. s.l. : Regulatory Toxicology and Pharmacology., 2016, Vols. 77 (2016) 13-24.
23. Establishing best practice in the application of expert review of mutagenicity under ICH M7. Barber, Chris, et al. s.l. : Regulatory Toxicology and Pharmacology., 2015, Vols. 73 (2015) 367-377.

24. A practical application of two *in silico* systems for identification of potentially mutagenic impurities. Greene, Nigel, et al. s.l. : Regulatory Toxicology and Pharmacology., 2015, Vols. 72 (2015) 335-349.
25. It's difficult, but important, to make negative predictions. Williams, Richard V., et al. s.l. : Regulatory Toxicology and Pharmacology., 2016, Vols. 76 (2016) 79-86.
26. *In silico* methods combined with expert knowledge rule out mutagenic potential of pharmaceutical impurities: An industry survey. Dobo, Krista L., et al. s.l. : Regulatory Toxicology and Pharmacology., 2012, Vols. 62 (2012) 449-455.
27. Kankan, Rajendra Narayanrao e Srinivas, Pathi L. Process for the preparation of pantoprazole sodium. WO2006064249 A2 22 de 06 de 2006.
28. An improved synthesis of 2-mercapto-5-difluoromethoxy-1Hbenzimidazole. Vora, Jabali J., Trivedi, Keyur P. e Kshatriya, Rahul S. Advances in Applied Science Research, India : Pelagia Research Library, 2011, Vols. 2 (3): 89-93.
29. Use of *in silico* systems and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities. Sutter, Andreas, et al. s.l. : Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2013, Vols. 67 (2013) 39-52.
30. Diretiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Novembro de 2001. Ques estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano, 28 de 11 de 2001, Jornal Oficial das Comunidades Europeias, Vol. JO L311, 67-128.
31. Potentially genotoxic impurities and European Pharmacopoeia monographs on substances for human use. 7 de 2008, Pharmeuropa, Vol. 20, 426-427.
32. (SWP), CHMP Safety Working Party. Question & Answers on the CHMP Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities, EMEA/CHMP/SWP/431994/2007. London : s.n., 9 de January de 2008.
33. CHMP e SWP. Questions and answers on the ' Guideline on the limits of genotoxic impurities': EMA/CHMP/SWP/431994/2007 Rev.3. European Medicines Agency. London : s.n., 23 de September de 2010.
34. The application of structure-based assessment to support safety and chemistry diligence to manage genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients during drug development. Dobo, Krista L. et all. 2006, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 282-293.

35. Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in the drug substances: A pharmaceutical industry perspective. Raman, S.V.V.S.S., Prasad, A.V.S.S. e Reddy, K. Ratnakar. India : s.n., 2011, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 55, 662-667.
36. Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process. Giordanl, Antonio, KobeL, Werner e Gally, Hans Ulrich. 2011, European Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 43, 1-15.
37. European Pharmacopoeia 10th Edition.
38. EMA/CPMP/ICH. Note for guidance on impurities in new drug products. CPMP/ICH/2738/99-ICH Q3B (R2). London : s.n., June de 2006.
39. Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products. Macgovern, Timothy e Jacobson-Kram, David. USA : s.n., 2006, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 25 No.8, 790-795.
40. The threshold of toxicological concern concept in risk assessment. Kroes, R., Kleiner, J. e Renwick, A. UK : s.n., 13 de April de 2005, Toxicological Sciences, 226-230.
41. EMEA/CMDh. Request to assess the risk of occurrence of contamination with mesilate esters and related compounds in pharmaceuticals. London : s.n., 27 de February de 2008.