

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
TOXICOLOGIA APLICADA



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE GUANIL
HIDRAZONAS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Toxicologia Aplicada

PEDRO RAFAEL DELLA CÔRTE DA ROSA

Orientador: Dra. JULIANA DA SILVA

Co-orientador: Dr. TALES LEANDRO COSTA MARTINS

CANOAS

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Genética Toxicológica da Central de Laboratórios da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), sendo financiado pelo Programa de Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada.

**Para Regina, Nicolau e Antônio,
pela ausência que apresentei,
pela compreensão e pelo carinho
que sempre me dedicam, em
especial no período do
desenvolvimento deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Juliana da Silva pela amizade, carinho, confiança e pelos ensinamentos que me foi passado durante o desenvolvimento do mestrado e de todas as atividades que desempenhei;

Ao meu co-orientador Tales Leandro Costa Martins pela amizade, atenção e compreensão que foi dada, e na síntese dos compostos utilizados neste trabalho;

A todos os professores do Programa de Mestrado pelo conhecimento dado durante todas as atividades;

Aos amigos de Laboratórios: Aline Groff, Valéria Pinhatti, Martus Ianistcki, Víncius Benvegnú, Tiago Dalpiaz, Paula Brisigueli, Eduardo Steefeld, Daniel Rampon, Fernanda Rabaioli e à Emilene Nunes pelo apoio, amizade e companheirismo durante os trabalhos;

Ao colega de outro laboratório Darlan Pase da Rosa pela ajuda na coleta de materiais biológicos;

A todos os meus grandes amigos que estiveram presentes nas horas difíceis deste trabalho, me apoiando e incentivando, entre eles Paulo Aguiar, Fernanda Kieling, Antônio Ruaro, Pedro Lubisco, André Bigolin, Rodrigo Schumaker, Diego Fontoura, Thaís Fernandes, Bruna Wurdig, Juliana Paulina Camila Mosmann, Mayara Anselmo, Ana Letícia, Cristiane, Deise Tebaldi entre outros tantos;

Aos meus colegas e amigos de trabalho Fábio, Adriano, Edemilson, Lúcio, Carla, Roberta e Luís Irineu, pelo apoio e compreensão;

À minha afilhada Giovana, por ter nos presenteado com a vida, durante o desenvolvimento das atividades;

À minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão que sempre me incentivaram, acreditando e depositando confiança. Agradeço pelo carinho e compreensão que despenderam durante toda a minha vida, sempre me apoiando.

SUMÁRIO

FIGURAS E TABELAS	06
RESUMO	08
ABSTRACT	09
I INTRODUÇÃO.....	10
I.1 Os Fármacos	10
I.2 Guanil Hidrazonas.....	11
I.3 Genotoxicidade x Fármacos	15
I.4 Metodologias Utilizadas Neste Estudo.....	17
I.4.1 Teste de Micronúcleos.....	17
I.4.2 Ensaio Cometa	18
II OBJETIVOS.....	20
III MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
III.1 Animais e Ambiente.....	21
III.2 Fármacos e Planos Teste	21
III.3 Teste: Controles e Grupos Teste.....	22
III.4 Teste de Micronúcleos.....	25
III.5 Ensaio Cometa	25
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
V REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Obtenção, estruturas e nomenclatura das guanil hidrazonas.....14

Figura 2. Observação em esfregaço de medula óssea de camundongo de eritrócito policromático (EPC) com micronúcleo (MN) e eritrócito normocromático (ENC).17

Figura 3. Visualização das classes de células "cometa", onde a "cabeça" representa o núcleo original e a "cauda" os fragmentos de DNA (Adaptado de VILLELA *et al.*, 2007).19

Figura 4. Estrutura das guanil hidrazonas Guanabenz (1) e GHBrPip (2) e funções orgânicas consideradas "estruturas alertas" em destaque. **A**-Hidrazona e **B**-Amino.....38

Figura 5. Estrutura do Bromo Catecol (3) como um possível metabólito para GHBrPip (2).39

Tabela 1.1. Valores observados nas pesagens (g) dos camundongos da linhagem CF1 para o composto Guanabenz (1).23

Tabela 1.2. Valores observados nas pesagens (g) dos camundongos da linhagem CF1 para o composto GHBrPip (2).24

Tabela 2.1. Ensaio de toxicidade. Porcentagem de mortalidade observada em várias doses durante o pré-teste para os Fármacos.28

Tabela 2.2. Teste de Micronúcleos em medula óssea de camundongos tratados com Guanabenz (1). Porcentagem de Eritrócitos Policromatófilos (EPC) (%) e número de eritrócitos policromatófilos com micronúcleos (mEPC) em 2000 eritrócitos, média e desvio padrão por sexo e por grupo.29

Tabela 2.3. Teste de Micronúcleos em medula óssea de camundongos tratados com GHBrPip (2). Porcentagem de Eritrócitos Policromatófilos (EPC) (%) e número de eritrócitos policromatófilos com micronúcleos (mEPC) em 2000 eritrócitos, média e desvio padrão por sexo e por grupo.29

Tabela 2.4. Teste de Micronúcleos em sangue periférico de camundongos tratados com Guanabenz (1). Número de eritrócitos com micronúcleos (mEPC) em 2000 eritrócitos, média e desvio padrão por sexo e por grupo.	30
Tabela 2.5. Teste de Micronúcleos em sangue periférico de camundongos tratados com GHBrPip (2). Número de eritrócitos com micronúcleos (mEPC) em 2000 eritrócitos, média e desvio padrão por sexo e por grupo.	31
Tabela 2.6. Detecção de Dano no DNA através do Ensaio Cometa em células do Sangue Periférico de Camundongos expostos ao Guanabenz (1) por 4h e 8h. ...	34
Tabela 2.7 Detecção de Dano no DNA através do Ensaio Cometa em células de diferentes tecidos de Camundongos expostos ao Guanabenz(1) por 72h.	35
Tabela 2.8. Detecção de Dano no DNA através do Ensaio Cometa em células do Sangue Periférico de Camundongos expostos ao GHBrPip (2) por 4h e 8h.	36
Tabela 2.9. Detecção de Dano no DNA através do Ensaio Cometa em células de diferentes tecidos de Camundongos expostos ao GHBrPip (2)por 72h.	37

RESUMO

Guanil Hidrazonas representam uma classe de substâncias que possuem uma variedade de atividades biológicas tais como antibacteriais, antimalariais e tripanocidas. Esses compostos podem afetar a saúde humana de várias maneiras devido a sua ação tóxica e, às vezes, até mutagênica. No desenvolvimento de novos fármacos, a avaliação da mutagenicidade é primordial. Neste estudo, buscou-se avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade de dois derivados de aril guanilhidrazonas, o 2,6-diclorobenzil- (Guanabenz-1) e o 2-bromo-4,5-metilenodioxibenzil- (Guanil hidrazona derivada do bromo piperonal -GHBrPip-2).

Os métodos utilizados foram o teste de Micronúcleos (MN) e o Ensaio Cometa em camundongos (*Mus musculus*). Os fármacos foram testados em grupos testes e grupos controle, sendo cada grupo formado por dez camundongos (5 machos e 5 fêmeas/grupo). As doses foram empregadas nas concentrações de 100%, 50% e 25% da DMT (Dose Máxima Tolerada). As concentrações de 1500, 750 e 375mg/Kg foram determinadas para o fármaco 2 e as concentrações 500, 250 e 125mg/Kg para o fármaco 1. Foram utilizados doses em três tempos (0h, 24h e 48h). Para os testes de Micronúcleos, foram utilizados sangue periférico e medula após 72h, e para o Ensaio Cometa foram coletados o Sangue Periférico para 4h, 8h e 72h, além da medula e do fígado após 72h. Os resultados obtidos pelo Método de Micronúcleo demonstraram para o fármaco sintetizado 1, na dose 500mg/Kg (mais alta), aumento significativo de danos ($P < 0,05$) na Medula Óssea, e para o derivado 2, nas doses 1500 e 750mg/Kg (mais alta e intermediária), aumento significativos ($P < 0,05$) para o Sangue Periférico. No Ensaio Cometa, todos os tecidos e doses, para os dois fármacos testados, demonstraram resultados significativos ($P < 0,05$) durante os três tempos. O Teste de MN e o Ensaio Cometa demonstraram sensibilidade quando estes animais foram expostos aos dois fármacos, apresentando um aumento no número de células com danos de DNA da espécie em estudo. Esses resultados indicam que a genotoxicidade é baixa para o Guanabenz (1), porém o GHBrPip (2) deverá receber atenção por ter apresentado tanto genotoxicidade como mutagenicidade em algumas doses em diferentes tecidos dos camundongos testados, assim sendo necessário mais estudos com esse composto antes de testes clínicos.

ABSTRACT

Guanylhyazones represent a class of substances which have a variety of biological activities, as anti-bacterials, antimalariais and trypanocides. These compounds can affect human health in various of ways due to its toxic and, sometimes, mutagenic action. In the development of new drugs, the evaluation of the mutagenicity is primordial. In this study, was evaluated the genotoxicity and mutagenicity of two derivatives of the aryl guanylhyazones, the 2,6-dichloro benzylidene- (1) and the 2-bromo-4,5-methylenedioxy- (2). The methods used were the test of micronucleous and the comet assay in mice (*Mus musculus*). The drugs were tested in different test groups and control groups, that each group was formed by ten individuals (5 males and 5 females/group). The doses were used representing the concentration of 100% (one hundred percent), 50% (fifty percent) and 25% (twenty-five percent) of the MTD (Maximum Tolerated Dose). The concentrations of 1500, 750 e 375mg/Kg were determined for the drug 2, and the concentrations of 500, 250 e 125mg/Kg, for the drug 1. Doses were used in three times (0h, 24h and 48h). For the tests of micronucleous were used peripheral blood and bone marrow after 72h, and for the comet assay were collected peripheral blood for 4h, 8h and 72h, besides the bone marrow and the liver after 72h. The results obtained by the micronucleous test, demonstrated for the synthesized drug 1, in the dose 500 mg/Kg (higher) significant increase of damages ($P < 0,05$) in the bone marrow, and for the drug 2, in the doses 1500 and 750mg/Kg (higher and intermediary), significant increases ($P < 0,05$) for the peripheral blood. In the Comet Assay, all the tissues and for both drugs were demonstrated significant results ($P < 0,05$) during the three times. The micronucleous test and the comet assay demonstrated sensibility when exposed these animals to these two drugs, presenting an increase in the DNA damaged cells of the studied species (being important for the genotoxic evaluation that may be caused by the drugs). These results indicate that the genotoxicity is low for the Guanabenz (1), however the GHBrPip (2), will have to receive attention for having presented as much genotoxicity as mutagenicity in some doses in different tissues of the tested mice, thus needing more studies with this compound before clinical trials.

I INTRODUÇÃO

I.1. Os Fármacos

Um fármaco é uma substância química que afeta a função fisiológica de modo específico, assim, ele deve atuar seletivamente sobre determinadas células e tecidos para poder apresentar resultado eficaz, como instrumento terapêutico e científico (RANG *et al.*, 2003).

Na pesquisa para obtenção de novos compostos farmacologicamente ativos, deve-se levar em conta as características estruturais da molécula que será obtida. Posteriormente, enquadrá-la em um ou mais grupos terapêuticos, analisando comparativamente com os fármacos já consagrados deste grupo.

Salienta-se que a associação a um grupo específico não assegura que a molécula tenha determinada atividade biológica, pois a ação de uma molécula depende de seu tamanho, estrutura e configuração espacial. Embora a atividade biológica esteja intimamente ligada aos grupos químicos presentes na molécula, não existe uma regra, e sim uma tendência entre grupos químicos de influenciar uma determinada atividade (ALBUQUERQUE, 1989).

Para se obter um composto com princípio ativo, que possa ser utilizado em terapêutica, é necessário que sejam testados aproximadamente 9000 compostos (KOROLKOVAS, 1988). As Indústrias Farmacêuticas têm demonstrado grande interesse no desenvolvimento de fármacos que sejam menos tóxicos, com eficácia terapêutica e que sejam de fácil manipulação, com baixo custo.

Com interesse no desenvolvimento dos fármacos, deve-se levar em consideração que a atividade biológica final de determinado composto não é necessariamente resultado do produto em si. Alterações na atividade de um composto podem ocorrer devido à reatividade química das moléculas, desse com

as do organismo e vice-versa (ALBUQUERQUE *et al.*, 1991). Além das moléculas do composto, outros fatores podem modificar a ação final. Alguns dos quais são:

(a) metabolização: quando uma substância é introduzida em um organismo ela sofre de metabolização, que pode transformá-la estruturalmente ou subdividi-la. Estes metabólitos podem ter atividades diversas do produto original;

(b) contaminação: pode ocorrer alteração na atividade devido a alguma contaminação. Isto pode ser evidenciado quando se analisa um composto que possui mais de 98% de natureza química, e a presença de pequena quantidade de impurezas mutagênicas (0,01 – 0,1%) produz um resultado mutagênico positivo (KROPKO *et al.*, 1992);

(c) processo físico: determinado processo físico pode modificar a composição inicial ou produzir algum subproduto, o que também altera a atividade. Por exemplo, a carne, que é cozida em altas temperaturas, produz uma variedade de aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, os quais possuem um significativo potencial genotóxico e carcinogênico (FENECH e NEVILLE, 1993);

(d) produção de radicais livres: entre os subprodutos podemos incluir os radicais livres. São espécies químicas ativadas que podem iniciar o processo carcinogênico, tais como os radicais oxigenados.

Nenhum fármaco é totalmente específico nas suas ações. Em muitos casos, o aumento na dose afeta outros alvos diferentes do alvo principal, podendo resultar em efeitos colaterais (RANG *et al.*, 2003). O resultado pode não ser devido ao próprio composto, mas sim a um resíduo intermediário, a um subproduto deste ou a alguma contaminação, resultados do processo de síntese (KROPKO *et al.*, 1992).

I.2. Guanil Hidrazonas

Guanil hidrazonas são amplamente reportadas na literatura e representam uma classe de substâncias que possuem uma variedade de atividades biológicas (RICHTER, 1993). Entre essas, se destacam as atividades microbiológicas e farmacológicas tais como: antihipertensivo (MAMOLO *et al.*, 1986a; 1983; FOYE, 1990), depressor do sistema nervoso central (BRUCE, 1974; KODAMA, 1976),

inibidor da agregação de plaquetas (DESIDERI, 1992; 1991; BERGE, 1983), antitumoral (ANDREANI, 2000; 1998; 1996; 1992), antileucêmico (KORYTNYK, 1978; 1973a; 1973b), antiviral (MANNINIPALENZONA, 1980; NISHIMUR, 1974), antibacteriana (GADAD, 2000; MAMOLO *et al.*, 1986b; BRUCE, 1974), antimalária (WERBEL, 1985; DOAMARAL, 1971; 1969; RUIZ, 1970), tripanocida (SUNDBERG, 1990; ULRICH, 1981), entre outras. Além disso, desempenham um papel importante como intermediários na construção de heterociclos polifuncionais contendo nitrogênios (GOSSNITZER, 2002; HOLZER, 1995; 1998; KURZER, 1963).

A função guanidina, com sua forte basicidade, é parte integrante de vários compostos biologicamente ativos e está intimamente relacionada a diversas dessas atividades (RICHTER, 1993). Representantes contendo tal subestrutura, as guanil hidrazonas podem ser sintetizadas através da condensação de sais de aminoguanidina com aldeídos ou cetonas, sendo geralmente obtidas e utilizadas na forma de seus sais. A nomenclatura desses compostos segundo a “International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)”, e também utilizada pelo “Chemical Abstract”, é 2-ilidenoimidazolidinonas, sendo também conhecidas como “alquilidenoaminoguanidinas”, “diaminometilenoimidazolidinonas” e “amidimidazolidinonas”.

Estudos realizados por Holzer (1996) enfocando a estereoquímica desses compostos mostram, através de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que o isômero preferencial para as guanil hidrazonas aromáticas é o que apresenta a configuração *E*. As referidas guanil hidrazonas podem ser facilmente sintetizadas a partir da reação de condensação entre um aldeído e o cloridrato de amino guanidina, sob irradiação em fornos de microondas. A reação procede em tempos pequenos (5 minutos) com bons rendimentos (80 – 98 %) (MARTINS, 2004). As estruturas das guanil hidrazonas (**1** e **2**) que serão utilizadas neste trabalho são apresentadas na Figura 1.

Guanil hidrazonas derivadas de benzofenonas halo substituídas, foram descritas por Doamaral e colaboradores (1971), por apresentarem atividade antimalária em testes preliminares, em ratos infectados com *Plasmodium berghei*. Gadad e colaboradores (2000) relataram recentemente a atividade bacteriana de algumas guanil hidrazonas derivadas de compostos heterocíclicos do tipo imidazo-tiodiazóis. Verificou-se que a presença do grupamento guanil hidrazona

realçou a atividade biológica das sulfonamidas precursoras. As guanil hidrazonas sintetizadas apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e, moderada atividade frente *Pseudomonas aeruginosa* (GADAD, 2000).

Dentro desta classe de compostos, podemos destacar também as biguanil hidrazonas. O estudo de uma série de biguanil hidrazonas derivadas de compostos alifáticos, como exemplo a derivada do metil glicoxal (MGBG), mostrou potencial ação antileucêmica em culturas de células TA-3 em ratos (KORYTNYK *et al.*, 1978). Várias biguanil hidrazonas análogas ao MGBG têm sido investigadas como agentes tripanossomicidas e antitumorais (ULRICH, 1982).

A principal característica estrutural, mostrada pelas guanil hidrazonas, é o terminal catiônico; essa parte da estrutura pode ter grande importância nas propriedades microbianas apresentadas por esses compostos. Algumas guanil hidrazonas foram estudadas e apresentaram valores de ID50 (Dose inibitória de 50% dos parasitas circulantes no sangue testado) muito superiores ao MGBG e o cristal violeta ou violeta genciana, que é empregado em bancos de sangue na quimioprofilaxia de sangue contaminado (MESSER, 1995).

Através de métodos de modelagem molecular, principalmente da metodologia de atracamento molecular (Docking), Santos-Filho (1996) estudou a interação destas guanil hidrazonas com a fenda menor do DNA. Em seus estudos, utilizando um fragmento de DNA de dupla fita com a seqüência de pares de base d(CGCGAATTCGCG)₂, foi verificada a interação preferencial do terminal guanidínico catiônico com os pares de bases A-T (Adenina-Timina), sugerindo que o mecanismo de ação dessas drogas seja através de sua interação com o DNA do parasita (SANTOS-FILHO, 1997). Posteriormente, estudos de interação de guanil hidrazonas com micelas de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) mostraram que a atividade desses compostos está relacionada com sua capacidade de diferenciar entre micelas catiônicas e aniônicas, sugerindo que o mecanismo de ação desses compostos pode se dar através de interação com a membrana plasmática dos parasitas (BORGES, 2001). Estudos sobre a capacidade desses compostos interagirem entre si e com proteínas plasmáticas mostraram que os compostos que mais auto-agregam são menos ativos contra *T. cruzi* e interagem menos com Albumina de Soro Bovino (BSA) (TINOCO, 1999), mas, até o momento, o mecanismo de ação desses compostos não foi revelado.

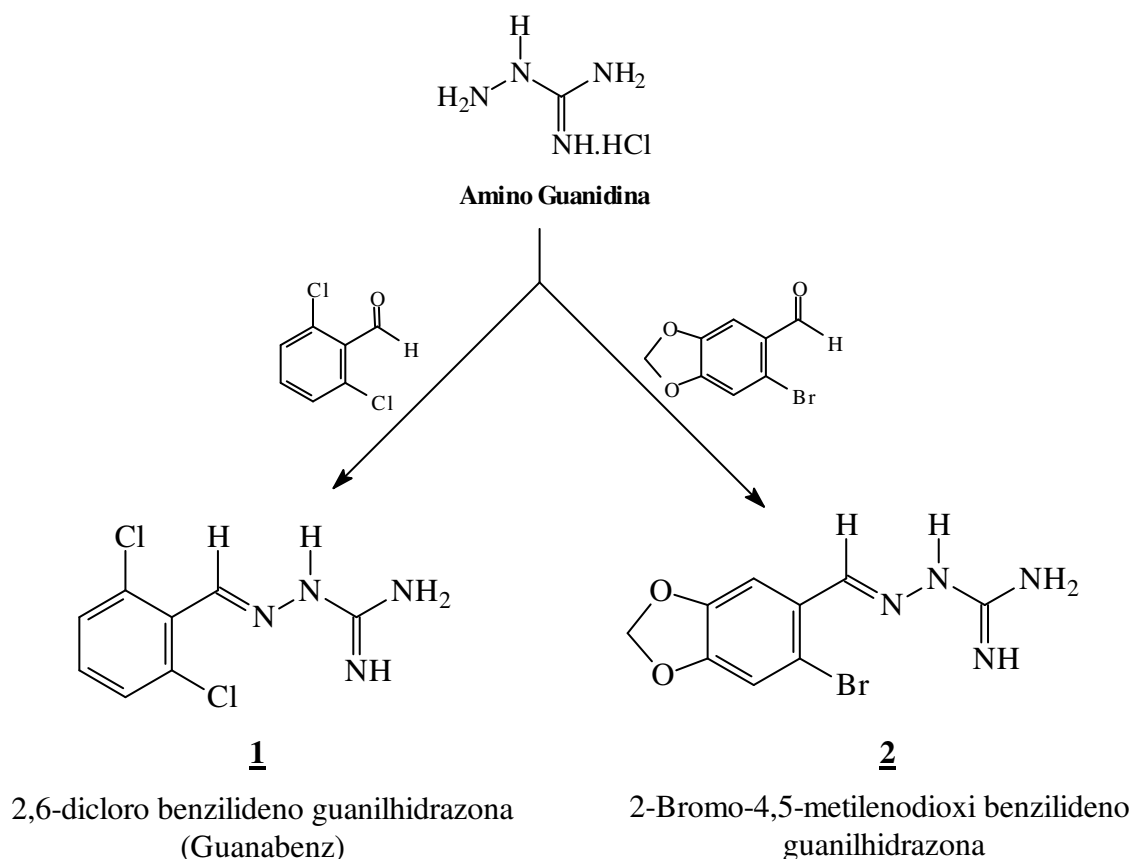


Figura 1. Obtenção, estruturas e nomenclatura das guanil hidrazonas.

Estudos mostram que as doses toleradas por algumas guanil hidrazonas, mais propriamente o acetato de Guanabenz (**1**), varia de 4 a 8 mg/kg, sem provocar carcinogênese e mutagênese (DRUGS, 2005). Esse composto é utilizado como anti-hipertensivo como descrito por Foye (1990) e Clement (1997). Atualmente, algumas patentes têm sido depositadas empregando o Guanabenz em composições farmacêuticas para o tratamento de danos neurológicos (LUNDSTEDT, 2006), e na produção de derivados utilizados no tratamento de fibrose cística (BECQ, 2007).

Como esses compostos apresentam custos acessíveis, e sua síntese é relativamente fácil, tornam-se apropriados para o uso em países pobres. O amplo espectro de atividades biológicas dos produtos sintetizados justifica a necessidade de maior conhecimento das potencialidades e limitações desses fármacos. Apesar disso, os efeitos mutagênicos provocados pelas guanil hidrazonas têm sido discutido. Foi demonstrado o efeito mutagênico para o Guanabenz, quando testado em linhagem de *Salmonella typhimutium*/Teste de

Ames (MCMAHON, 1977). Poucos são os testes realizados com esses fármacos e nenhum outro teste veio a complementar os achados de McMahon (1977). Já para o fármaco novo, o 2-Bromo-4,5-metilenodioxibenzilideno guanilhidrazona, que apresenta eficácia contra o *T. cruzi* (MESSEDER, 1995), não existe na literatura nenhum dado sobre seus efeitos danosos. A partir daí, e das demais atividades que esses compostos apresentam, surge a necessidade de complementar dados relacionados a genotoxicidade das guanil hidrazonas.

I.3. Genotoxicidade x Fármacos

Durante as últimas décadas, a quantidade de produtos químicos novos produzidos e utilizados por nossa sociedade vem aumentando. Esses produtos podem afetar a saúde humana de várias maneiras devido a sua ação tóxica e, às vezes, até mutagênica (ARAÚJO, 1990).

Existe uma tendência de se considerar somente os produtos sintéticos como potencialmente nocivos à saúde e ao genoma. Mas, aproximadamente metade de todos os produtos testados, tanto sintéticos como naturais, são mutagênicos e/ou carcinogênicos. Há um ditado bastante antigo, e que pode ser aplicado para a genética toxicológica: “a dose faz o veneno” (AMES, 1989). A ação dos diversos agentes genotóxicos é muito similar tanto nos animais como no homem (HEDDLE *et al.*, 1983), sendo capaz de causar danos citogenéticos por vários mecanismos.

Para que uma mutação se estabeleça e possa ser transmitida através das gerações, é preciso que determinadas condições sejam preenchidas. Após ocorrer alguma lesão no DNA, essa pode ser corrigida ou não com fidelidade. Se não ocorrer um reparo fiel, existe diversas possibilidades e conseqüências: (a) o DNA ser inviável, não sendo possível duplicar-se; (b) morte celular ou do indivíduo; (c) impossibilidade de reprodução; (d) e se não acontecer nenhuma das situações anteriores, a mutação pode ser fixada, desde que não ocorra redução notória da fertilidade ou inviabilidade de seus portadores (AMES, 1989).

Mutações cromossômicas causam, geralmente, problemas graves como a inviabilidade da célula e/ou do organismo. Em humanos, estão quase sempre associadas a severas desordens clínicas e ao câncer (HEDDLE *et al.*, 1983;

SHEER, 1987). Os fármacos devem ser caracterizados adequadamente para poder traçar uma conduta adequada para seu uso e níveis admissíveis para a exposição humana. Um aspecto que merece atenção especial é a variabilidade humana, já que existem indivíduos mais sensíveis que outros a determinados agentes (HSU, 1983; RUDD *et al.*, 1988).

Dependendo do tipo de lesão que se quer detectar, são necessários diferentes testes (SALAMONE e HEDDLE, 1983; COLE e SKOPEK, 1994). Centenas desses testes são conhecidos, mas dificilmente é viável ou mesmo necessário utilizar um grande número de bioensaio para se fazer uma avaliação do potencial mutagênico. Os testes recomendados para detectar atividade mutagênica são também indicados na avaliação do potencial carcinogênico, pois a maior parte dos químicos que apresentam mutagenicidade podem também induzir o câncer. Segundo Lohman *et al.* (1992), o produto mutagênico *in vivo* é também carcinogênico no organismo (multicelular) testado.

O consenso das agências internacionais determina, hoje, que uma bateria de testes deva ser composta no mínimo de: reversão bacteriana, como por exemplo, o teste de Ames, testes *in vitro* e *in vivo* de dano cromossômico. Para detecção de danos cromossômicos, os mais utilizados incluem as aberrações cromossômicas e micronúcleos sendo que esses exigem que as células estejam em estado proliferativo (TICE *et al.*, 1988; LE CURIEUX *et al.*, 1993). O estudo de aberrações cromossômicas possibilita a identificação de quase todas as alterações na estrutura do cariótipo. Mas, hoje em dia, por haver técnicas para detecção de mutações cromossômicas mais rápidas e simples, como o teste de Micronúcleos, o estudo de aberrações cromossômicas é apenas utilizado em situações recomendadas, como derrimir dúvidas, definir os tipos de mutação, validar outras metodologias, etc. Recentemente, vem sendo recomendado também a utilização do Ensaio Cometa que detecta quebras no DNA, como método indicativo de genotoxicidade.

I.4. Metodologias Utilizadas Neste Estudo

I.4.1. Teste de Micronúcleos

Inicialmente, observados e identificado por Mather em 1937 (SALAMONE e HEDDLE, 1983), os micronúcleos (MNs) mostrados na Figura 2 são massas cromatídicas citoplasmáticas com a aparência de um pequeno núcleo (SCHMID, 1975; HEDDLE *et al.*, 1983), o qual é conhecido na hematologia pela denominação de corpúsculo de Howel-Jolly (SCHMID, 1975).

Após a separação das cromátides no processo mitótico, dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor desses dois conjuntos de cromossomos. Mas, se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), esse também pode constituir um pequeno núcleo individual chamado micronúcleo. Os micronúcleos, então, são pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como conseqüência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos e/ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda de material genético por quebra cromossômica. O teste de micronúcleos, portanto, detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese (VILLELA *et al.*, 2003).

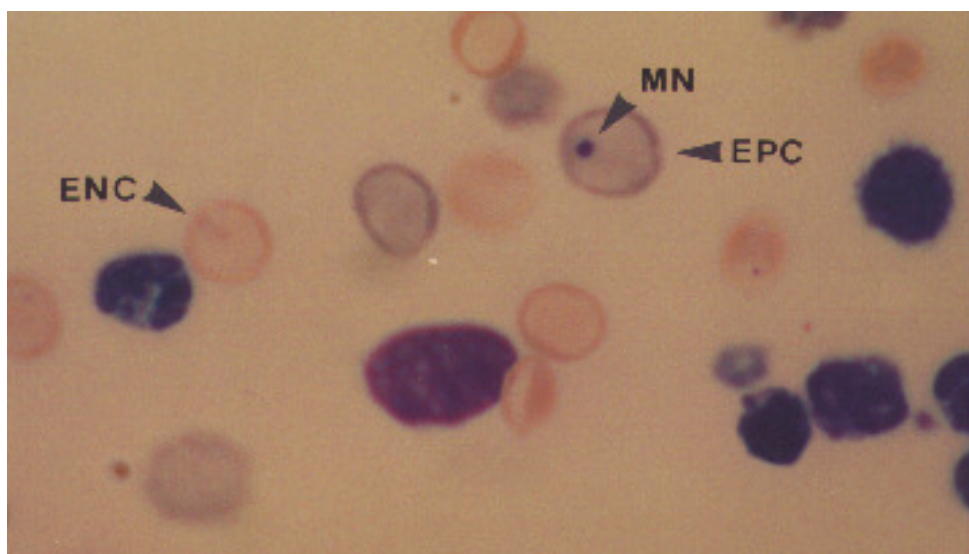


Figura 2. Observação em esfregaço de medula óssea de camundongo de eritrócito policromático (EPC) com micronúcleo (MN) e eritrócito normocromático (ENC).

O teste de MN é realizado em eritrócitos jovens, denominados policromatófilos (EPC), que por conterem RNA ribossomal se coram de forma diferenciada (com corantes para ácidos nucléicos). Enquanto que para avaliações de exposição crônica, os MNs são avaliados tanto em EPC, como nos eritrócitos maduros, que são denominados de normocromatófilos (ENC), devido à coloração homogênea (por conter somente hemoglobina).

A análise da frequência de MN em EPC de medula óssea de mamíferos foi estabelecida na década de 70 por Schmid e, ainda hoje, é uma das mais utilizadas como padrão de aberrações cromossômicas em eucariotos. A análise, por ser muito simples, apresenta vantagem em relação à análise dos cromossomos. Os micronúcleos podem ser identificados em qualquer tipo de célula. Podem-se avaliar micronúcleos para diagnóstico de doenças hematológicas em células epiteliais da boca, do trato urinário, e também monitorar ambientes através desse teste em roedores, plantas e peixes, por exemplo. Contudo, para que o MN seja visualizado é necessária uma divisão celular após o evento mutagênico, por isso, ou precisa-se fazer cultivo celular, ou usar células que estão se multiplicando constantemente, como as da medula óssea (VILLELA *et al.*, 2003).

I.4.2. Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa ou SCGE (Single Cell Gel Eletrophoresis Assay) é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos no DNA induzidos por diversos agentes (VILLELA *et al.*, 2003). Esse pode ser realizado, tanto em animais como em plantas, demonstrando grande sensibilidade e rapidez de resultados em estudos de genotoxicidade. Esse ensaio apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre estes a necessidade de um pequeno número de células e de não ser necessário células em divisão. Dois protocolos principais são disponíveis para a execução do teste, de acordo com o pH: a) versão neutra, que detecta quebras duplas nas moléculas de DNA e *crosslinks*; e b) versão alcalina, que detecta quebras de fita única e dupla, sítios alcali-lábeis, e *crosslinks*. Nesse sentido, danos indiretos no DNA promovem efeitos como

metilação e adutos, que, sendo alcalilábeis se expressam como quebras simples frente ao tratamento alcalino (VILLELA *et al.*, 2003).

Além de células sanguíneas, as células de órgãos ou tecidos também podem ser utilizadas, mas essas têm que ser liberadas em forma de suspensão. As células são englobadas em gel sobre uma lâmina e são submetidas a uma corrente elétrica que faz migrar para fora do núcleo os segmentos de DNA livres, resultantes de quebras. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada por fragmentos de DNA (Figura 3). Esses fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (FARBAIRN *et al.*, 1995). Para alguns autores o tamanho da cauda é proporcional ao dano que foi causado (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993), mas somente é de consenso que a visualização do "cometa" significa dano ao nível do DNA, podendo ser quebras simples, duplas e/ou lesões álcali-lábeis (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993; FAIRBAIRN, 1995; TICE, 1995).

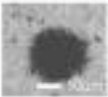
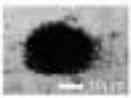



Dano observado	Cabeça/cauda	Classes de dano
	Sem cauda	0
	≤ 1	1
	1 - 2	2
	≥ 2	3
	Sem cabeça	4

Figura 3. Visualização das classes de células "cometa", onde a "cabeça" representa o núcleo original e a "cauda" os fragmentos de DNA (Adaptado de VILLELA *et al.*, 2007).

II OBJETIVOS

Através da pesquisa na área de síntese de fármacos, e com a intenção de se obter fármacos menos danosos, principalmente aqueles de amplo espectro, muitos testes toxicológicos têm sido realizados utilizando-se Guanil Hidrazonas. Dando continuidade a este processo e objetivando avaliar os fármacos Guanil Hidrazonas (2,6-dicloro benzilideno guanilhidrazona e 2-Bromo-4,5-metilenodioxibenzilideno guanilhidrazona), pretendeu-se neste trabalho:

1. Avaliar se esses fármacos induzem ou não genotoxicidade em diferentes tecidos de camundongos, através do Teste de Micronúcleos e Ensaio Cometa;
2. Verificar as possíveis correlações entre os testes de genotoxicidade, Teste de Micronúcleo e Ensaio Cometa.

III MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Animais e Ambiente

Foram utilizados 50 camundongos da espécie *Mus musculus* da linhagem exocruzada CF1 oriundos do Biotério da ULBRA, sediada em Canoas. Os animais foram mantidos em temperatura controlada. Eles foram tratados em gaiolas de propileno recebendo água e ração da marca Nuvital CR1. Os camundongos somente foram usados no teste após, no mínimo, uma semana de aclimação.

III.2. Fármacos e Planos Teste

Para este estudo, foram utilizadas Guanil Hidrazonas, sintetizadas no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do CEPPE/ULBRA, utilizando-se o método descrito por Martins (2004). Os produtos obtidos nas reações foram analisados através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C).

As substâncias-teste administradas, foram diluídas com água destilada e dimetilsulfoxido – DMSO – (40%) – conforme determinado em pré-teste de solubilidade, sendo determinadas as doses máximas toleradas (DMT) para os animais.

Os fármacos foram testados em grupos de 6 camundongos (3 machos e 3 fêmeas), avaliando-se as possíveis diferenças de sensibilidade entre machos e fêmeas. As doses foram empregadas nas concentrações de 100% (dose máxima tolerada), 50% e 25%, sendo determinadas em pré-teste partindo-se das concentrações de 2000, 1000 e 500 mg/kg, conforme recomendação de Hayashi *et al.* (2000).

III.3. Teste: Controles e Grupos Teste

A população total do experimento para cada fármaco foi dividida aleatoriamente em cinco grupos, contendo dez camundongos cada grupo.

Grupo Controle Negativo: 5 machos e 5 fêmeas com doses em três tempos (0h, 24hs e 48hs) do solvente (10ml/kg).

Grupo Controle Positivo: 5 machos e 5 fêmeas com doses em dois tempos de ciclofosfamida (eduxan) (2 x 25 mg/kg).

Grupo Teste 1: 5 machos e 5 fêmeas com doses em três tempos onde a dose apresenta a concentração máxima da substância teste (100%).

Grupo Teste 2: 5 machos e 5 fêmeas com doses em três tempos onde a dose apresenta a concentração média da substância teste (50%).

Grupo Teste 3: 5 machos e 5 fêmeas com doses em três tempos onde a dose apresenta a concentração mínima da substância teste (25%).

A solução foi preparada imediatamente antes da administração por via oral (Gavage), observando a absorção do composto e os efeitos tóxicos.

Os animais foram pesados antes da dosagem oral e o volume que foi administrado foi calculado de acordo com o peso do animal (0,1 mL da substância teste por 10 g do animal).

Os pesos medidos dos camundongos para cada grupo podem ser visualizados na Tabela 1.1, onde se observa os pesos dos camundongos que foram dosados com o composto Guanabenz (1), na Tabela 1.2, daqueles dosados com o Guanil Hidrazona do Bromo piperonal (GHBrPip (2)).

Tabela 1.1. Valores observados nas pesagens (g) dos camundongos da linhagem CF1 para o composto Guanabenz (1).

Grupo Dose	Dias	Sexo	Resultados Individuais					Por Sexo	Por Grupo
3X C –	Dia 1	Macho	26,3	28,5	27,8	29,0	27,8	27,88 ± 1,02	27,12 ± 1,12
		Fêmea	25,7	26,7	26,7	25,8	26,9	26,36 ± 0,56	
	Dia 2	Macho	27,4	29,8	29,0	30,2	28,3	28,94 ± 1,13	27,94 ± 1,38
		Fêmea	27,4	26,1	27,5	26,2	27,5	26,94 ± 0,72	
	Dia 3	Macho	27,2	27,3	28,8	30,6	28,1	28,40 ± 1,39	27,63 ± 1,35
		Fêmea	27,0	25,6	27,3	26,6	27,8	26,86 ± 0,83	
	Dia 4	Macho	26,0	25,5	27,7	30,6	27,1	27,38 ± 2,00	26,43 ± 1,74
		Fêmea	26,4	24,5	25,2	25,3	26,0	25,48 ± 0,74	
3X 125	Dia 1	Macho	25,6	27,1	26,0	27,4	26,3	26,48 ± 0,75	26,84 ± 1,39
		Fêmea	25,3	26,3	26,6	30,2	27,6	27,20 ± 1,87	
	Dia 2	Macho	22,1	24,5	22,9	27,5	24,6	24,32 ± 2,07	24,65 ± 1,74
		Fêmea	24,0	23,4	24,9	27,3	25,3	24,98 ± 1,50	
	Dia 3	Macho	21,9	24,5	22,7	25,7	24,5	23,86 ± 1,53	24,34 ± 1,62
		Fêmea	23,3	24,0	25,3	27,6	23,9	24,82 ± 1,72	
	Dia 4	Macho	20,8	22,4	21,4	23,8	22,2	22,12 ± 1,14	22,56 ± 1,49
		Fêmea	21,5	21,7	23,0	26,0	22,8	23,00 ± 1,80	
3X 250	Dia 1	Macho	28,4	26,6	29,9	26,9	28,0	27,96 ± 1,32	28,2 ± 2,11
		Fêmea	27,6	29,1	26,9	25,6	33,0	28,44 ± 2,84	
	Dia 2	Macho	24,0	21,7	24,9	23,8	22,8	23,44 ± 1,23	25,35 ± 3,40
		Fêmea	27,9	27,8	24,8	22,7	33,1	27,26 ± 3,93	
	Dia 3	Macho	21,6	20,1	22,2	23,5	20,3	21,54 ± 1,40	24,17 ± 4,11
		Fêmea	27,7	27,6	23,7	21,9	33,1	26,80 ± 4,32	
	Dia 4	Macho	19,1	18,5	20,3	20,8	19,2	19,58 ± 0,94	22,35 ± 4,32
		Fêmea	27,1	25,3	20,8	20,6	31,8	25,12 ± 4,68	
3X 500	Dia 1	Macho	28,4	26,6	27,7	28,9	32,0	28,72 ± 2,03	27,55 ± 1,89
		Fêmea	25,5	27,1	25,9	26,3	27,1	26,38 ± 0,72	
	Dia 2	Macho	27,2	24,0	25,1	25,5	30,7	26,50 ± 2,61	25,48 ± 2,24
		Fêmea	23,6	25,8	23,9	23,0	26,0	24,46 ± 1,36	
	Dia 3	Macho	25,8	22,5	22,9	24,8	29,4	25,08 ± 2,77	24,38 ± 2,40
		Fêmea	23,2	26,0	23,0	20,9	25,3	23,68 ± 2,03	
	Dia 4	Macho	24,7	20,8	22,7	23,4	27,6	23,84 ± 2,53	22,86 ± 2,18
		Fêmea	22,5	22,5	22,0	19,5	22,9	21,88 ± 1,37	
2X C+	Dia 1	Macho	25,1	30,1	27,2	29,6	27,6	27,92 ± 2,01	28,12 ± 1,62
		Fêmea	28,7	29,9	28,9	27,7	26,4	28,32 ± 1,33	
	Dia 2	Macho	23,2	28,6	26,2	26,2	24,7	25,78 ± 2,01	26,54 ± 1,66
		Fêmea	27,9	27,6	28,1	26,8	26,1	27,30 ± 0,83	
	Dia 3	Macho	21,8	26,9	24,2	24,6	24,4	24,38 ± 1,81	24,48 ± 1,42
		Fêmea	24,5	25,6	25,8	23,6	23,4	24,58 ± 1,11	

Legenda: C-: Água+40%DMSO, C+: Ciclofosfamida, Dose: mg/Kg, †: Óbito

Tabela 1.2. Valores observados nas pesagens (g) dos camundongos da linhagem CF1 para o composto GHBrPip (2).

Grupo Dose	Dias	Sexo	Resultados Individuais					Por Sexo	Por Grupo
3X C -	Dia 1	Macho	31,4	27,4	30,9	26,6	28,4	28,94 ± 2,12	29,35 ± 1,80
		Fêmea	29,2	28,3	31,4	31,4	28,5	29,76 ± 1,53	
	Dia 2	Macho	30,2	27,7	31,7	26,0	27,7	28,66 ± 2,27	29,21 ± 2,15
		Fêmea	28,2	27,5	31,2	32,6	29,3	29,76 ± 2,11	
	Dia 3	Macho	29,9	28,0	31,7	26,2	27,3	28,62 ± 2,19	29,25 ± 2,10
		Fêmea	28,4	27,8	31,9	32,2	29,1	29,88 ± 2,04	
Dia 4	Macho	28,6	26,6	29,9	26,2	26,1	27,48 ± 1,69	28,37 ± 2,21	
	Fêmea	26,8	27,4	32,1	31,7	28,3	29,26 ± 2,47		
3X 375	Dia 1	Macho	29,5	26,7	29,4	28,5	32,1	29,24 ± 1,95	29,47 ± 1,54
		Fêmea	30,0	31,1	30,2	29,2	28,0	29,70 ± 1,17	
	Dia 2	Macho	31,1	28,5	29,1	30,3	32,8	30,36 ± 1,70	30,78 ± 1,50
		Fêmea	32,4	32,0	31,5	31,1	29,0	31,20 ± 1,32	
	Dia 3	Macho	31,1	28,9	26,3	31,1	33,1	30,10 ± 2,59	30,30 ± 2,05
		Fêmea	31,4	32,1	30,1	31,0	27,9	30,50 ± 1,62	
Dia 4	Macho	31,4	29,1	27,3	30,2	32,9	30,18 ± 2,14	30,59 ± 1,70	
	Fêmea	30,8	32,0	31,3	31,9	29,0	31,00 ± 1,22		
3X 750	Dia 1	Macho	32,9	35,9	27,0	32,6	28,8	31,44 ± 3,54	30,22 ± 3,14
		Fêmea	32,9	26,6	27,5	28,6	29,4	29,00 ± 2,43	
	Dia 2	Macho	33,0	33,1	24,0	34,1	28,3	30,50 ± 4,27	30,48 ± 3,18
		Fêmea	33,7	27,8	29,7	30,4	30,7	30,46 ± 2,13	
	Dia 3	Macho	31,8	29,4	25,1	33,3	27,1	29,34 ± 3,34	29,50 ± 3,21
		Fêmea	33,3	28,5	24,3	30,9	31,3	29,66 ± 3,45	
Dia 4	Macho	30,2	28,9	24,8	34,4	25,7	28,80 ± 3,84	28,96 ± 3,50	
	Fêmea	33,4	28,7	23,6	29,5	30,4	29,12 ± 3,56		
3X 1500	Dia 1	Macho	30,7	31,6	30,1	27,7	†	30,03 ± 1,67	30,23 ± 1,34
		Fêmea	†	†	†	30,5	30,8	30,65 ± 0,21	
	Dia 2	Macho	25,6	25,5	30,9	27,1	†	27,28 ± 2,53	27,55 ± 2,24
		Fêmea	†	†	†	26,5	29,7	28,10 ± 2,26	
	Dia 3	Macho	23,6	22,3	30,4	26,4	†	25,68 ± 3,58	26,07 ± 3,47
		Fêmea	†	†	†	23,7	30,0	26,85 ± 4,45	
Dia 4	Macho	21,0	20,3	28,4	24,5	†	23,55 ± 3,72	24,45 ± 3,43	
	Fêmea	†	†	†	24,3	28,2	26,25 ± 2,76		
2X C+	Dia 1	Macho	29,4	33,9	30,2	31,6	29,7	30,96 ± 1,85	29,83 ± 1,91
		Fêmea	27,3	29,1	27,8	30,6	28,7	28,70 ± 1,28	
	Dia 2	Macho	31,2	34,3	32,5	32,7	30,8	32,30 ± 1,38	30,69 ± 2,09
		Fêmea	27,8	29,4	28,0	30,7	29,5	29,08 ± 1,19	
	Dia 3	Macho	30,7	35,3	31,4	33,3	31,8	32,50 ± 1,83	30,98 ± 2,19
		Fêmea	28,3	30,1	28,0	31,0	29,9	29,46 ± 1,27	

Legenda: C-: Água+40%DMSO, C+: Ciclofosfamida, Dose: mg/Kg; †:Óbito

III.4. Teste de Micronúcleos

Este trabalho foi realizado tendo-se como base o protocolo recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – EPA (MAVOURMIN *et al.*, 1990; MILLER *et al.*, 1997).

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, seguindo recomendações da OECD. Posteriormente, o preparo seguiu a seguinte seqüência: (a) os fêmures dos camundongos foram removidos, limpos e as duas extremidades foram cortadas; (b) a medula óssea foi extraída com uma agulha histológica e em seguida colocada sobre a lâmina com uma gota de soro bovino fetal. Após, procedeu-se a homogenização e o esfregaço de cada fêmur (2 lâminas/animal); (c) após a preparação do esfregaço, as lâminas foram secas e coradas com uma mistura de 60 mL de Giemsa, 30 mL de May-Grünwald Giemsa e 10 mL de tampão fosfato (pH 5,8) por 5 minutos; (d) em seguida, foram enxaguadas em água destilada, secas em temperatura ambiente. A análise foi feita às cegas, seguindo o modelo zig-zag, para evitar o cruzamento da mesma área mais de uma vez, uma série de campos ao acaso foram observados com lente de imersão.

Inicialmente, foi determinada a relação entre os linfócitos jovens (policromatófilos-EPC) e os maduros (normocromatófilos-ENC), em 1000 eritrócitos de cada roedor. Essa relação foi realizada para evitar falsos-negativos devido a falta de EPC. De cada animal, foram contados 2.000 EPC, sendo 1.000 EPC de cada lâmina, registrando-se a freqüência de micronúcleos por lâmina e por animal.

A análise estatística foi conduzida utilizando ANOVA (teste Dunnett), onde valores de $P < 0,05$ e $P < 0,01$ foram considerados estatisticamente significativos.

III.5. Ensaio Cometa

As amostras para o Ensaio Cometa foram obtidas a partir do sangue total e de suspensão celular do Fígado e Medula Óssea dos animais. Os tecidos foram dissecados e colocados em solução de salina tamponada pH 7,4 (PBS) a 4°C

para obtenção de suspensão celular descrito por SINGH *et al.* (1988) e modificado por SILVA *et al.*(2000).

As amostras foram misturadas com uma fina camada de agarose “low melting” 0,75% e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%. As lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por 48 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. Após a incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos e subsequente aplicação de corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos, as lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com prata.

Foram analisadas 100 células por indivíduo (50 de cada lâmina duplicada), em microscópio. As células foram classificadas visualmente em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sem danos (classe 0) até danos máximos (classe 4). Assim, o índice de danos de cada grupo estudado pode ir do zero (100x0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100x4; 100 células observadas com dano máximo).

A análise estatística foi conduzida utilizando ANOVA (teste Dunnett), onde valores de $P < 0,05$ e $P < 0,01$ foram considerados estatisticamente significativos.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa de novos fármacos no País assume relevância inusitada quando eleita como parte integrante da política industrial. Afinal, foi reconhecido que os fármacos e os medicamentos são instrumentos imprescindíveis à assistência farmacêutica, eficiente e segura à população. Portanto, fármacos e medicamentos são instrumentos essenciais de inclusão social, necessários à plena soberania da Nação (BARREIRO E FRAGA, 2005).

As Guanil Hidrazonas são compostos de síntese relativamente fácil, tornam-se apropriadas para o uso em países pobres. O amplo espectro de atividades biológicas destes produtos sintetizados justifica a necessidade de maior conhecimento das potencialidades e limitações desses fármacos, bem como avaliação de efeitos mutagênicos.

Na literatura, não existem trabalhos relacionados à mutagenicidade e genotoxicidade com referência a guanil hidrazona derivada do bromopiperonal (GHBrPip - **2**) e poucos são os trabalhos já publicados com referência a sua obtenção e sua estrutura química, porém o Guanabenz (**1**) é utilizado comercialmente no tratamento para a hipertensão e possui outras aplicações (ver introdução). A partir de nossos resultados, poderão ser feitos testes mais específicos quanto à atividade farmacológica de GHBrPip (**2**), conforme procedimento padrão do desenvolvimento de fármacos, pois a determinação do *status* genotóxico dos produtos da farmacologia é rotina, devido a estreita relação entre mutações e câncer.

Os compostos sintetizados, o Guanabenz (**1**) e a guanil hidrazona derivada do bromopiperonal (GHBrPip, **2**), foram analisados segundo sua capacidade de produzir danos cromossômicos em eucariotos, através dos testes de MNs em medula óssea e sangue periférico, e através do Ensaio Cometa em medula óssea, fígado e sangue periférico de camundongos tratados. Devido ao avanço dessas metodologias e a solicitação de agências de controle sobre a regulação de produtos, relativo à toxicidade química, essas técnicas vêm sendo utilizadas rotineiramente em laboratórios do mundo inteiro.

Para determinação das doses a serem utilizadas nos testes, foram realizados pré-testes. Nesses testes preliminares foram utilizados grupos de seis

camundongos, sendo três machos e três fêmeas da linhagem exocruzada CF1, por dose testada. Nesse experimento, as doses foram definidas em função da toxicidade da substância teste. Todos os sistemas teste foram dosados três vezes com a mesma dose (24 e 48 horas após a primeira dosagem) e sacrificados 24 horas após a última dosagem. Os resultados em relação à mortalidade para cada droga podem ser observados na Tabela 2.1..

Tabela 2.1. Ensaio de toxicidade. Porcentagem de mortalidade observada em várias doses durante o pré-teste para os Fármacos.

Substância	Dose Diária (mg/Kg)	Mortalidade (%)	Mortalidade (%) Macho/Fêmea
Guanabenz	3X125	Zero	Zero/Zero
	3X250	Zero	Zero/Zero
	3X500	Zero	Zero/Zero
	3X1000	50	20/30
	3X2000	100	100/100
GHBrPip	3X375	Zero	Zero/Zero
	3X500	20*	Zero/20*
	3X750	Zero	Zero/Zero
	3X1000	10*	Zero/10*
	3X1500	40*	10*/30*
	3X2000	100	100/100

- Mortalidade observada provavelmente devido ao erro na dosagem (*gavage*). Nos animais sobreviventes nenhum sinal de toxicidade foi observado.

Devido à mortalidade e toxicidade observada nos camundongos, bem como a solubilidade da droga, a dose de 500 mg/Kg foi considerada como dose máxima para o Guanabenz (1), e a de 1500 mg/Kg para a guanil hidrazona do bromo piperonal (GHBrPip (2)).

Nas Tabelas 2.2 e 2.3, podemos observar os resultados referentes ao Teste de Micronúcleos em medula óssea de camundongos tratados com o Guanabenz (1) e GHBrPip (2). Observou-se que tanto o Guanabenz (1) como o GHBrPip (2) não demonstraram induzir toxicidade, pois a frequência de EPC em relação ao ENC não variou de forma significativa entre todos os grupos.

Tabela 2.2. Teste de Micronúcleos em medula óssea de camundongos tratados com Guanabenz (1). Porcentagem de Eritrócitos Policromatófilos (EPC) (%) e número de eritrócitos policromatófilos com micronúcleos (mEPC) em 2000 eritrócitos, média e desvio padrão por sexo e por grupo.

Grupo (dose em mg/kg)	Sexo	mEPC					EPC (%)			
		Individual								
		(mEPC/2000EPC)		Por Sexo		Por Grupo				
						M ± D.P.	M ± D.P.	mEPC(%)		
Controle Negativo ^a	Macho	3	2	1	1	2	1,80 ± 0,84	1,60 ± 0,97	0,8	63,9
	Fêmea	0	1	3	2	1	1,40 ± 1,14			
Controle Positivo ^b	Macho	3	5	5	2	3	3,60 ± 1,34	3,60 ± 1,07**	1,8	62,8
	Fêmea	3	4	3	5	3	3,60 ± 0,89			
3X125	Macho	3	1	1	0	0	1,00 ± 1,22	1,60 ± 1,17	0,8	64,9
	Fêmea	1	2	2	3	3	2,20 ± 0,84			
3X250	Macho	4	1	1	0	2	1,60 ± 1,52	1,80 ± 1,23	0,9	62,3
	Fêmea	3	1	2	3	1	2,00 ± 1,00			
3X 500	Macho	1	3	2	2	3	2,20 ± 0,84	2,70 ± 1,25	1,4	63,0
	Fêmea	4	3	1	5	3	3,20 ± 1,48			

^a Controle Negativo=3XÁgua+40%DMSO.; ^b Controle Positivo= 2X25 mg/kg de ciclofosfamida, **P<0,01.

Tabela 2.3. Teste de Micronúcleos em medula óssea de camundongos tratados com GHBrPip (2). Porcentagem de Eritrócitos Policromatófilos (EPC) (%) e número de eritrócitos policromatófilos com micronúcleos (mEPC) em 2000 eritrócitos, média e desvio padrão por sexo e por grupo.

Grupo	Sexo	mEPC					EPC (%)			
		Individual								
		(mEPC/2000EPC)		Por Sexo		Por Grupo				
						M ± D.P.	M ± D.P.	mEPC(%)		
Controle Negativo ^a	Macho	2	1	3	5	1	2,40 ± 1,67	2,40 ± 1,43	1,2	62,1
	Fêmea	3	4	3	1	1	2,40 ± 1,34			
Controle Positivo ^b	Macho	5	4	4	5	5	4,60 ± 0,55	4,40 ± 0,84*	2,2	55,7
	Fêmea	4	3	4	6	4	4,20 ± 1,10			
3X375	Macho	3	2	2	1	1	1,80 ± 0,84	2,30 ± 0,95	1,2	60,9
	Fêmea	2	3	3	2	4	2,80 ± 0,84			
3X750	Macho	2	1	1	0	1	1,00 ± 0,71	1,90 ± 1,91	1,0	59,8
	Fêmea	4	3	6	1	0	2,80 ± 2,39			
3X1500	Macho	8	3	4	6	†	5,25 ± 2,22	4,50 ± 2,43*	2,3	56,0
	Fêmea	†	†	†	5	1	3,00 ± 2,83			

^a Controle Negativo=3XÁgua+40%DMSO.; ^b Controle Positivo= 2X25 mg/kg de ciclofosfamida.

*P<0,05.

Comparando-se o número de eritrócitos policromatófilos micronucleados (EPCMN), observados nos diferentes grupos, para a medula óssea (Tabela 2.2 e 2.3), observa-se que para o Guanabenz (1) não ocorreu nenhum aumento significativo de células com micronúcleos em relação ao controle negativo. Para o GHBrPip (2) verificou-se que na dose 3X1500 ocorre aumento significativo de células com micronúcleos em relação ao controle negativo.

Para o sangue periférico (Tabela 2.4 e 2.5) o Guanabenz (1) demonstrou induzir aumento significativo de células com micronúcleos somente na dose de 3X250 mg/kg em relação ao controle negativo. Porém, o GHBrPip (2) apresentou diferenças significativas para as doses 3X750 e 3X1500 mg/kg em relação ao controle negativo.

Tabela 2.4. Teste de Micronúcleos em sangue periférico de camundongos tratados com Guanabenz (1). Número de eritrócitos com micronúcleos (mEPC) em 2000 eritrócitos, média e desvio padrão por sexo e por grupo.

Grupo (dose em mg/kg)	Sexo	mEPC							mEPC(%)
		Individual (mEPC/2000EPC)					Por Sexo	Por Grupo	
							M ± D.P.	M ± D.P.	
Controle Negativo	Macho	5	3	5	6	3	4,40 ± 1,34	4,00 ± 1,15	2,0
	Fêmea	3	5	4	3	3	3,60 ± 0,89		
Controle Positivo	Macho	5	8	8	3	5	5,80 ± 2,17	5,70 ± 1,57*	2,9
	Fêmea	6	5	7	5	5	5,60 ± 0,89		
3X 125	Macho	3	7	7	6	5	5,60 ± 1,67	4,30 ± 2,41	2,2
	Fêmea	4	4	1	6	0	3,00 ± 2,45		
3X 250	Macho	5	5	6	5	8	5,80 ± 1,30	5,70 ± 1,06*	2,9
	Fêmea	7	6	5	5	5	5,60 ± 0,89		
3X 500	Macho	7	5	3	3	5	4,60 ± 1,67	4,90 ± 1,20	2,5
	Fêmea	5	6	5	5	5	5,20 ± 0,45		

^a Controle Negativo= 3XÁgua+40%DMSO; ^b Controle Positivo= 2X25 mg/kg de ciclofosfamida; * P<0,05, significativo em relação ao controle negativo, Teste ANOVA.

Tabela 2.5. Teste de Micronúcleos em sangue periférico de camundongos tratados com GHBrPip (2). Número de eritrócitos com micronúcleos (mEPC) em 2000 eritrócitos, média e desvio padrão por sexo e por grupo.

Grupo	Sexo	mEPC							mEPC(%)
		Individual					Por Sexo	Por Grupo	
		(mEPC/2000EPC)					M ± D.P.	M ± D.P.	
Controle Negativo	Macho	5	5	4	7	5	5,20 ± 1,10	5,00 ± 1,15	2,5
	Fêmea	5	4	4	4	7	4,80 ± 1,30		
Controle Positivo	Macho	9	11	7	6	9	8,40 ± 1,95	8,30 ± 1,77**	4,2
	Fêmea	7	7	7	9	11	8,20 ± 1,79		
3X375	Macho	7	9	8	4	4	6,40 ± 2,30	5,70 ± 1,77	2,9
	Fêmea	5	4	6	5	5	5,00 ± 0,71		
3X750	Macho	6	9	7	6	6	6,80 ± 1,30	7,20 ± 1,93*	3,6
	Fêmea	8	8	7	11	4	7,60 ± 2,51		
3X1500	Macho	10	8	9	9	†	9,00 ± 0,82	8,17 ± 1,47**	4,1
	Fêmea	†	†	†	6	7	6,50 ± 0,71		

^a Controle Negativo= 3XÁgua+40%DMSO; ^b Controle Positivo= 2X25 mg/kg de ciclofosfamida; * P<0,05, ** P<0,01, significativo em relação ao controle negativo – Teste ANOVA.

Em relação ao teste de MNs, os controles positivos, tanto para o Guanabenz (1) como para o GHBrPip (2), demonstraram aumento significativo de células com micronúcleos em relação aos respectivos controles negativos (Tabelas 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5). Resultado esse que valida o referido teste realizado neste trabalho (MAVOURMIN *et al.*, 1990; MILLER *et al.*, 1997).

As Guanil Hidrazonas também foram avaliadas pelo Ensaio Cometa em diferentes tecidos de camundongos, observando-se os índices de danos e freqüência de danos (Tabela 2.6, 2.7, 2.8 e 2.9).

No sangue periférico dos camundongos tratados com Guanabenz (1) observou-se aumento significativo de danos no DNA em relação ao controle negativo para as doses 3X250 e 3X500 mg/Kg (índice e freqüência de danos) após 4 h (Tabela 2.6). Após 8h, somente o grupo de 3X500 mg/Kg mostrou resposta positiva para o índice de dano. Entre os sexos não se observou diferença significativa. Para os resultados após 72h (diferentes tecidos, Tabela 2.7), observamos no sangue periférico diferenças significativas para o controle positivo, 3X125 mg/kg e 3X250 mg/kg, para o índice e freqüência de danos. Para o fígado, todos os grupos apresentaram aumentos significativos em relação ao

controle negativo, para índice e frequência de danos. Para a medula óssea, observou-se aumento significativo do índice de danos e frequência de danos para todos os grupos, com exceção do grupo 3X250 mg/kg em relação a frequência de danos. Nesse mesmo grupo, observa-se um aumento significativo do índice de danos nas fêmeas em relação aos machos.

Quando os camundongos foram tratados com o GHBrPip (2) no sangue periférico observou-se aumento significativo de dano em relação ao controle negativo para as doses 3X375 mg/Kg (índice de dano) e 3X375 e 3X1500 mg/Kg (frequência de dano) após 4 h (Tabela 2.8). Após 8h, os grupos de 3X375 e 3X750 mg/Kg (índice de danos), e os grupos 3X375, 3X750 e 3X1500 mg/Kg para frequência de dano mostraram diferenças significativas. Para os tempos de tratamento de 4 e 8h não se observou diferença significativa de células com danos de DNA entre os diferentes sexos. Para os resultados após 72h (diferentes tecidos – Tabela 2.9), observamos para o sangue periférico diferenças significativas para os grupos controle positivo, 3X375, 3X750 e 3X1500 mg/kg, para o índice e frequência de danos em relação ao controle negativo. Entre os sexos ocorreu aumento significativo no índice de dano das fêmeas em relação aos machos no grupo 3X750 mg/Kg, e aumento significativo das fêmeas em relação aos machos para os grupos controle negativo e 3X750 mg/Kg, além do aumento dos machos em relação as fêmeas no controle positivo para a frequência de dano. Para o fígado, somente o grupo controle positivo apresentou aumento significativo em relação ao controle negativo, para índice e frequência de danos, não havendo diferença entre os sexos. Para a medula óssea, observa-se aumento significativo do índice de danos e frequência de danos para todos os grupos. Neste tecido observa-se um aumento significativo do índice e frequência de danos das fêmeas em relação aos machos para o grupo 3X750 mg/Kg. Diferente do Guanabenz (1), o GHBrPip (2) parece ter seu pico de efeito um pouco depois, devido a observarmos um resultado genotóxico pouco mais pronunciado a 8h. Também verifica-se que o GHBrPip (2) além da genotoxicidade demonstrou efeito mutagênico, observado principalmente através do aumento de micronúcleos em células do sangue periférico.

Com esses dois ensaios, verifica-se que o Ganabenz (1) já apresenta resposta genotóxica logo nas primeiras horas após a administração, a qual é reduzida logo em seguida. Fato esse está de acordo com a literatura que diz que

de 2-4h após exposição temos o pico de efeito farmacológico, com uma meia vida de 12h (DRUGS, 2005). Essa genotoxicidade observada acaba não levando a mutagenicidade, provavelmente devido à biotransformação que o Guanabenz sofre, seus metabólitos podem levar a indução de enzimas P450. Provavelmente a CYP1A2 seja a principal responsável pela metabolização (CLEMENT e DEMESMAEKER, 1997). Mesmo se tratando de droga comercial, o Guanabenz (1) foi somente avaliado para mutagenicidade pelo teste de *Salmonella/microsossoma* (Teste de Ames). Os resultados para diferentes cepas no Teste de Ames demonstraram ser negativo (CLEMENT, 1997), o que reforça os nossos resultados de MNs. Estudos em ratos também não demonstraram a capacidade desta droga causar efeitos carcinogênicos (DRUGS, 2005).

As diferenças observadas neste estudo, entre os resultados dos testes de MN e Ensaio Cometa, têm também sido observadas por diferentes autores (MALUF E ERDTMANN, 2000; PITARQUE *et al.*, 2002; HEUSER *et al.*, 2007). Esse fato se explica devido ao Teste de MN ser capaz de detectar o efeito final e mutagênico, enquanto o Ensaio Cometa o efeito inicial e genotóxico, incluindo danos reparáveis de muitos agentes farmacológicos.

Tabela 2.6. Detecção de Dano no DNA através do Ensaio Cometa em células do Sangue Periférico de Camundongos expostos ao Guanabenz (1) por 4h e 8h.

Grupo (Dose/mg/Kg) ^a	Sexo	Tempo de exposição e Parâmetros do Ensaio Cometa					
		4 h			8 h		
		Índice Dano (ID)					
		n	Por Sexo	Por Grupo	n	Por Sexo	Por Grupo
Água+40%DMSO (1X)	Macho	5	3,00 ± 2,35	3,44 ± 2,13	4	15,00 ± 9,59	12,33 ± 6,80
	Fêmea	4	4,00 ± 2,00		5	10,20 ± 3,27	
Grupo 1 (1X125)	Macho	5	8,00 ± 3,08	8,30 ± 5,03	5	3,40 ± 2,07	3,50 ± 2,37
	Fêmea	5	8,60 ± 6,88		5	3,60 ± 2,88	
Grupo 2 (1X250)	Macho	5	11,20 ± 5,12	14,90 ± 8,48**	5	7,00 ± 4,47	7,11 ± 3,33
	Fêmea	5	18,60 ± 10,06		4	7,25 ± 1,71	
Grupo 3 (1X500)	Macho	5	9,20 ± 5,26	11,7 ± 7,66*	5	44,20 ± 26,53	33,00 ± 22,60**
	Fêmea	5	14,20 ± 9,42		5	21,80 ± 11,50	
Frequência Dano (%)							
Água+40%DMSO (1X)	Macho	5	2,60 ± 1,52	3,00 ± 1,58	4	11,50 ± 6,24	9,33 ± 4,72
	Fêmea	4	3,50 ± 1,73		5	7,60 ± 2,61	
Grupo 1 (1X125)	Macho	5	6,20 ± 1,92	6,60 ± 3,86	5	3,00 ± 1,87	3,10 ± 2,08*
	Fêmea	5	8,00 ± 5,72		5	3,20 ± 2,49	
Grupo 2 (1X250)	Macho	5	9,00 ± 3,74	11,20 ± 5,49**	5	6,20 ± 4,09	6,56 ± 3,09
	Fêmea	5	13,40 ± 6,47		4	7,00 ± 1,63	
Grupo 3 (1X500)	Macho	5	7,20 ± 4,21	8,70 ± 4,90*	5	15,80 ± 9,65	13,70 ± 7,38
	Fêmea	5	10,20 ± 5,54		5	11,60 ± 4,28	

^aSignificante para P<0.05 em relação ao controle negativo; ** P<0.01; ANOVA Dunnet's

Tabela 2.7 Detecção de Dano no DNA através do Ensaio Cometa em células de diferentes tecidos de Camundongos expostos ao Guanabenz(1) por 72h.

Grupo (Dose/mg/Kg) ^a	Sexo	Tecidos e Parâmetros do Ensaio Cometa								
		Sangue Periférico			Fígado			Medula Óssea		
		n	Por Sexo	Por Grupo	Índice Dano (ID)			n	Por Sexo	Por Grupo
					n	Por Sexo	Por Grupo			
Água+40%DMSO	Macho	4	34,25 ± 25,86	24,89 ± 18,27	5	10,20 ± 4,82	15,80 ± 10,62	5	19,20 ± 13,37	22,70 ± 12,71
	Fêmea	5	17,40 ± 2,79		5	21,40 ± 12,34		5	26,20 ± 12,42	
Grupo 1 (3X125)	Macho	5	83,80 ± 38,56	100,00 ± 38,65**	4	115,50 ± 25,90	113,67 ± 23,36**	5	89,40 ± 32,06	83,22 ± 32,45**
	Fêmea	4	120,25 ± 31,90		5	112,20 ± 24,13		4	75,50 ± 35,99	
Grupo 2 (3X250)	Macho	5	59,60 ± 18,84	78,60 ± 33,88**	5	60,40 ± 20,70	73,80 ± 29,40**	5	58,60 ± 12,01	77,00 ± 29,49**
	Fêmea	5	97,60 ± 36,41		5	87,20 ± 32,68		4	100,00 ± 29,27*	
Grupo 3 (3X500)	Macho	5	35,60 ± 30,45	32,60 ± 22,02	5	51,60 ± 25,38	69,90 ± 30,08**	5	85,20 ± 58,63	78,50 ± 42,98**
	Fêmea	5	29,60 ± 11,89		5	88,20 ± 23,55		5	71,80 ± 24,61	
Ciclofosfamida (2X)	Macho	4	68,75 ± 21,79	87,25 ± 40,06**	5	131,40 ± 47,86	140,80 ± 53,33**	4	133,25 ± 21,95	153,25 ± 40,41**
	Fêmea	4	105,75 ± 48,54		5	150,20 ± 62,35		4	173,25 ± 47,57	
Frequência Dano (%)										
Água+40%DMSO	Macho	4	18,00 ± 16,43	14,33 ± 10,72	5	6,80 ± 4,76	10,70 ± 7,63	5	13,20 ± 6,38	16,00 ± 6,80
	Fêmea	5	11,40 ± 1,82		5	14,60 ± 8,38		5	18,80 ± 6,61	
Grupo 1 (3X125)	Macho	5	42,60 ± 9,53	50,89 ± 14,62**	4	59,25 ± 8,42	54,33 ± 12,08**	5	56,40 ± 20,19	57,10 ± 15,20**
	Fêmea	4	61,25 ± 13,82		5	50,40 ± 13,97		5	57,80 ± 10,52	
Grupo 2 (3X250)	Macho	5	39,00 ± 9,03	44,30 ± 12,13**	5	34,20 ± 10,03	38,50 ± 11,27**	5	13,20 ± 6,38	15,56 ± 7,06
	Fêmea	5	49,60 ± 13,39		5	42,80 ± 11,78		4	18,50 ± 7,59	
Grupo 3 (3X500)	Macho	5	21,20 ± 11,78	21,70 ± 9,53	5	31,60 ± 13,32	38,60 ± 12,90**	5	43,20 ± 17,89	41,10 ± 13,08**
	Fêmea	5	22,20 ± 8,07		5	45,60 ± 8,65		5	39,00 ± 7,31	
Ciclofosfamida (2X)	Macho	4	41,25 ± 10,11	43,50 ± 13,60**	5	59,60 ± 15,37	57,90 ± 15,48**	4	72,75 ± 26,51	72,00 ± 23,38**
	Fêmea	4	45,75 ± 17,76		5	56,20 ± 17,20		4	71,25 ± 23,91	

*Significante para P<0.05 em relação ao controle negativo; ** P<0.01; ANOVA Dunnet's

Tabela 2.8. Detecção de Dano no DNA através do Ensaio Cometa em células do Sangue Periférico de Camundongos expostos ao GHBpPip (2) por 4h e 8h.

Grupo (Dose/mg/Kg)a	Sexo	Tempo de exposição e Parâmetros do Ensaio Cometa					
		4 h			8 h		
		Índice Dano (ID)					
		n	Por Sexo	Por Grupo	n	Por Sexo	Por Grupo
Água+40%DMSO (1x)	Macho	5	17,00 ± 10,46	16,30 ± 9,01	5	10,60 ± 7,67	10,90 ± 6,62
	Fêmea	5	15,60 ± 8,47		5	11,20 ± 6,30	
Grupo 1 (1X375)	Macho	5	22,20 ± 6,80	28,50 ± 11,43*	5	45,20 ± 3,96	61,60 ± 25,06**
	Fêmea	5	34,80 ± 12,19		5	78,00 ± 26,93	
Grupo 2 (1X750)	Macho	5	21,80 ± 7,89	20,56 ± 6,44	5	35,80 ± 6,87	36,40 ± 10,56**
	Fêmea	4	19,00 ± 4,69		5	37,00 ± 14,25	
Grupo 3 (1X1500)	Macho	4	28,25 ± 14,17	26,83 ± 11,27	4	28,00 ± 9,42	28,67 ± 7,61
	Fêmea	2	24,00 ± 2,83		2	30,00 ± 4,24	
Frequência Dano (%)							
Água+40%DMSO (1X)	Macho	5	10,60 ± 5,90	9,20 ± 4,76	5	8,80 ± 5,93	8,40 ± 4,70
	Fêmea	5	7,80 ± 3,35		5	8,00 ± 3,74	
Grupo 1 (1X375)	Macho	5	16,40 ± 5,32	18,70 ± 6,17**	5	25,40 ± 2,88	30,60 ± 9,26**
	Fêmea	5	21,00 ± 6,63		5	35,80 ± 10,83	
Grupo 2 (1X750)	Macho	5	15,80 ± 6,57	14,67 ± 5,24	5	23,20 ± 3,96	21,40 ± 4,01**
	Fêmea	4	13,25 ± 3,30		5	19,60 ± 3,51	
Grupo 3 (1X1500)	Macho	4	16,25 ± 7,04	16,50 ± 5,47*	4	19,00 ± 7,53	20,50 ± 7,50**
	Fêmea	2	17,00 ± 0,00		2	23,50 ± 9,19	

*Significante para P<0.05 em relação ao controle negativo; ** P<0.01; ANOVA Dunnet's

Tabela 2.9. Detecção de Dano no DNA através do Ensaio Cometa em células de diferentes tecidos de Camundongos expostos ao GHBrPip (2) por 72h.

		Tecidos e Parâmetros do Ensaio Cometa								
		Sangue Periférico			Fígado			Medula Óssea		
		Índice Dano (ID)								
Grupo (Dose/mg/Kg) ^a	Sexo	n	Por Sexo	Por Grupo	n	Por Sexo	Por Grupo	n	Por Sexo	Por Grupo
Água+40%DMSO	Macho	5	9,20 ± 5,26	15,50 ± 10,38	5	22,40 ± 5,68	20,90 ± 5,22	5	44,80 ± 10,89	46,60 ± 13,13
	Fêmea	5	21,80 ± 10,76		5	19,40 ± 4,83		5	48,40 ± 16,15	
Grupo 1 (3X375)	Macho	5	102,60 ± 43,33	90,90 ± 41,17**	5	18,40 ± 16,33	13,10 ± 12,62	5	184,20 ± 21,04	197,60 ± 26,74**
	Fêmea	5	79,20 ± 39,93		5	7,80 ± 4,60		5	211,00 ± 26,79	
Grupo 2 (3X750)	Macho	5	47,60 ± 19,98	72,30 ± 33,61**	5	10,80 ± 3,63	13,30 ± 9,10	5	135,60 ± 32,32	170,50 ± 47,83**
	Fêmea	5	97,00 ± 24,85*		5	15,80 ± 12,56		5	205,40 ± 32,53**	
Grupo 3 (3X1500)	Macho	4	88,00 ± 36,78	91,50 ± 33,18**	4	16,50 ± 4,43	17,33 ± 5,75	4	131,75 ± 46,47	134,83 ± 37,87**
	Fêmea	2	98,50 ± 36,06		2	19,00 ± 9,90		2	141,00 ± 24,04	
Ciclofosfamida (2X)	Macho	5	106,80 ± 42,58	91,50 ± 38,07**	5	77,00 ± 42,64	61,40 ± 35,10**	5	210,40 ± 27,11	222,30 ± 26,68**
	Fêmea	5	76,20 ± 29,39		5	45,80 ± 18,61		5	234,20 ± 22,64	
Frequência Dano (%)										
Água+40%DMSO	Macho	5	5,80 ± 3,11	8,80 ± 4,66	5	15,20 ± 2,17	14,50 ± 2,72	5	22,60 ± 6,02	25,60 ± 7,03
	Fêmea	5	11,80 ± 4,09*		5	13,80 ± 3,27		5	28,60 ± 7,23	
Grupo 1 (3X375)	Macho	5	47,60 ± 17,27	44,20 ± 17,27**	5	11,80 ± 8,35	9,10 ± 6,72	5	69,40 ± 6,23	72,40 ± 6,20**
	Fêmea	5	40,80 ± 18,54		5	6,40 ± 3,71		5	75,40 ± 5,03	
Grupo 2 (3X750)	Macho	5	25,00 ± 7,18	36,30 ± 13,94**	5	8,80 ± 2,17	9,50 ± 5,10	5	55,40 ± 15,32	66,90 ± 16,67**
	Fêmea	5	47,60 ± 8,14**		5	10,20 ± 7,26		5	78,40 ± 7,73*	
Grupo 3 (3X1500)	Macho	4	41,50 ± 13,96	42,00 ± 11,49**	4	14,75 ± 4,86	13,50 ± 4,93	4	67,75 ± 23,39	64,00 ± 19,03**
	Fêmea	2	43,00 ± 8,49		2	11,00 ± 5,66		2	56,50 ± 0,71	
Ciclofosfamida (2X)	Macho	5	54,80 ± 11,82*	45,20 ± 14,45**	5	29,80 ± 14,81	24,90 ± 12,52*	5	76,60 ± 7,89	79,90 ± 6,72**
	Fêmea	5	35,60 ± 9,99		5	20,00 ± 8,57		5	83,20 ± 3,49	

*Significante para P<0.05 em relação ao controle negativo; ** P<0.01; ANOVA Dunnet's

Mesmo o Guanabenz (1) e a GHBpPip (2) sendo derivados de guanil hidrazonas aromáticas, as diferenças nos efeitos genotóxicos e mutagênicos observados podem estar relacionados às diferenças estruturais que elas apresentam. A genotoxicidade, como um todo, representa a capacidade de induzir danos ao material genético, e isso está intimamente relacionado com a estrutura química desses compostos (MADLE e LANG, 1993).

Existem diversas estruturas consideradas como “estruturas alertas”, essas são relacionadas com resultados positivos em testes carcinogênicos e mutagênicos em diferentes tecidos e organismos. Essas estruturas são normalmente utilizadas para reconhecer os compostos que possam apresentar genotoxicidade, embora esta correlação não seja perfeita (ASHBY E TENNANT, 1991).

Segundo Ashby e Tennant (1991), grupamentos Hidrazona (A) e Amino (B) (Figura 4) são considerados como “estruturas alertas” em diversos compostos que são carcinogênicos e/ou mutagênicos. Tais grupamentos estão presentes na estrutura principal das guanil hidrazonas, como o Guanabenz (1) e a GHBpPip (2) e podem estar relacionados com as atividades desses compostos.

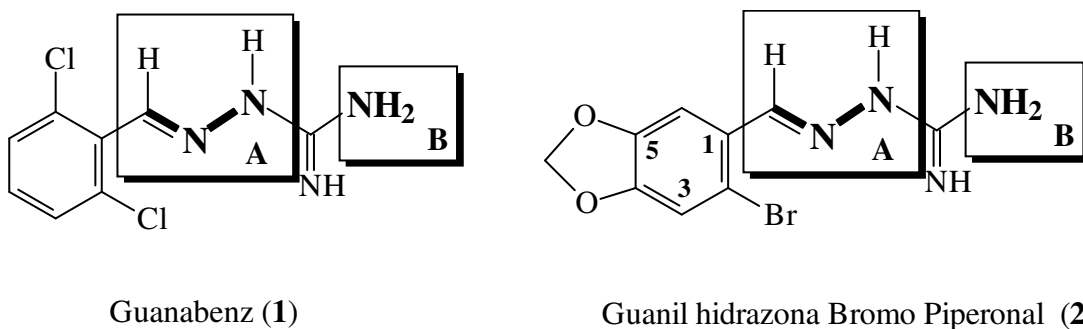
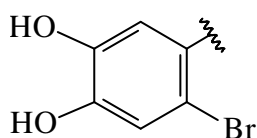


Figura 4. Estrutura das guanil hidrazonas Guanabenz (1) e GHBpPip (2) e funções orgânicas consideradas “estruturas alertas” em destaque. **A**-Hidrazona e **B**-Amino.

Essas estruturas estão relacionadas, principalmente com a indução de mutagenicidade e carcinogenicidade, em diferentes tecidos e organismos (ASHBY E TENNANT, 1991; SAWATARI *et al.*, 2001). As “estruturas alertas”, presentes nas Guanil Hidrazonas, também estão relacionadas com a formação de radicais livres (KATZUNG, 1998). Os radicais livres são conhecidos por induzirem lesões no DNA

(PICADA *et al.*, 2003), que podem ser observadas pelo Ensaio Cometa, e que, na maioria das vezes, são corrigidas pelo mecanismo de reparo (SAFFI E HENRIQUES, 2003). Essas observações poderiam justificar os efeitos genotóxicos observados para as duas drogas. Embora a presença de grupamentos com o bromo e com o cloro pareça ser a maior diferença nas estruturas, elas não são consideradas como “estruturas alertas” (ASHBY E TENNANT, 1991). O que nos leva a deduzir, apesar de não serem “estruturas alertas”, que a provável diferença entre as drogas seja devido à influência do bromo ou do cloro sobre a metabolização/detoxificação das drogas.

Analisando todos os dados obtidos podemos observar que o composto Guanabenz (1) foi mais genotóxico do que a GHBrPip (2) somente para o fígado, como observado pela indução de danos no ensaio cometa. Isso pode ser atribuído à capacidade das estruturas de cloro associado ao anel benzênico, apenas presentes no Guanabenz (1), de induzir principalmente genotoxicidade e carcinogenicidade especificamente em fígado de roedores (ASHBY E TENNANT, 1991). Enquanto a metabolização do esqueleto aromático do GHBrPip (2) contaria com o auxílio do citocromo P450 (KATZUNG, 1998), além de se observar, por exemplo, a possibilidade de formação de estruturas do tipo bromo catecol (3) (Figura 5), estrutura esta relacionada com indução de enzimas de detoxificação Glutathione S-transferase (GST) (JOSEPHY, 1997). Dessa forma, o GHBrPip (2) pode formar compostos hidrofílicos (mais polares), mais fáceis de serem eliminados.



(3)

Figura 5. Estrutura do Bromo Catecol (3) como um possível metabólito para GHBrPip (2)

Apesar desses fatos e dos resultados sobre o fígado, a GHBrPip (2) foi mais mutagênico que o Guanabenz (1) pelo teste de MN em sangue periférico, embora não se tenha observado no teste de micronúcleos dose-resposta, nem aumento duplicador de micronúcleos; que segundo Mavournin *et al.* (1990) e Miller *et al.* (1997) são fatores importantes para definir uma droga como mutagênica. Talvez possamos inferir que, apesar de eliminado pelo fígado com facilidade, o composto

que possui a estrutura com bromo, GHBrPip (2), induz lesões que não sejam tão facilmente reparadas, provavelmente por produzir além dos radicais livres, interações entre as pontes de hidrogênio entre as fitas de DNA.

Assim, através do Teste de MNs e o Ensaio Cometa, a GHBrPip (2) foi mais genotóxica e mais mutagênica que o Guanabenz (1). O Guanabenz (1) realmente não é considerado mutagênico mesmo apresentando “estruturas alertas” (ASHBY E TENNANT, 1991; JOSEPHY, 1997; KATZUNG, 1998; SAWATARI *et al.*, 2001). Uma das explicações possíveis que pode ser dada é que existem em organismos aeróbicos mecanismos contra as degradações oxidativas do DNA. A esses mecanismos são incluídos o de reparo do DNA, a ação de enzimas e de aminoácidos, que são capazes de minimizarem os efeitos danosos às células (CLAYSON *et al.*, 1994).

Finalmente, cabe ressaltar que esses resultados foram observados em doses máximas toleradas, assim, não devem ser consideradas alarmantes, já que dificilmente altas doses de fármacos são prescritas ao homem. Se alguma conclusão pode ser inferida através de nossos resultados, é que a genotoxicidade é bastante baixa para o Guanabenz (1), parecendo não haver nenhuma contra-indicação, porém o GHBrPip (2), deverá receber atenção por ter apresentado tanto genotoxicidade como mutagenicidade em algumas doses e diferentes tecidos dos camundongos testados, assim necessitando mais estudos com esse composto antes de testes clínicos.

V REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C.N. *Novos N-aril 2,3-piridinocarboxamidas: Estudo químico e farmacológico*. 1989. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas: "Análise, Síntese e Controle de Medicamentos") – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.

ALBUQUERQUE, C.N., BACHA, C.T.M., SCHAPOVAL, E.E.S.; LOISEAU, P.; FLORES, S.B. *Novos N-aril 2,3-piridinocarboxamidas: Estudo químico e farmacológico*. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 72, p. 31-33, 1991.

AMES, B.N. *Mutagenesis and Carcinogenesis: Endogenous and Exogenous Factors*. *Environmental Molecular Mutagenesis*, v. 16, p. 66-77, 1989.

ANDREANI, A.; LEONI, A., LOCATELLI, A. Potential coanthracyclinic activity of pyridylmethylene-2-indolinones, anticancer. *Mutation Research*, v. 18, n. 5., p. 3407-3409, 1998.

ANDREANI, A.; LEONI, A.; LOCATELLI, A.; MORIGI, R.; RAMBALDI, M.; RECANATINI, M.; GARALIENE, V. Potential antitumor agents. Part 29: synthesis and potential coanthracyclinic activity of imidazo [2,1-b] thiazole guanylhydrazones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 2359-2366, 2000.

ANDREANI, A., RAMBALDI, M.; LEONI, A. Potential antitumor agents .24. Synthesis and pharmacological behavior of imidazo [2,1-b] thiazole guanylhydrazones bearing at least one chlorine. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 14., p. 2852-2855, 1996.

ANDREANI, A.; RAMBALDI, M.; LOCATELLI, A. Potential Antitumor Agents .21. Structure Determination and Antitumor-Activity of Imidazo [2,1-b] Thiazole Guanylhydrazone. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 35, n. 24., p. 4634-4637, 1992.

ARAÚJO, M.C.P. *Um novo enfoque para o estudo de mutações gênicas e cromossômicas ocorridas in vivo em linfócitos humanos*. 1990. 95 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

ASHBY, J. E TENNANT, R.W. Determination of the genotoxic status of a chemical. *Mutation Research*, v. 248, p.221-231, 1991.

BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR). *Química Nova*, v. 28, p. 56-63, 2005.

BECQ, F.; BLONDEL, M.; TRIBOULLARD, D. Use of guanabenz and its derivatives for making drugs for treating cystic fibrosis and diseases related to a protein addressing deficiency in the cells. *PCT Int. Appl.*, 2007.

BERGE, G.; DARMANADEN, R.; ARTISNOEL, A.M. Substituted Guanylhydrazones – QSAR and Invitro Inhibition of Platelet-Aggregation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 1., p. 45-50, 1983.

BORGES, M.N.; FIGUEROA-VILLAR; J.D. NMR interaction studies of aromatic guanyl hydrazones with micelles: Model for mechanism of action of cationic antibiotics. *Biopolymers*, v. 62, n. 1., p. 9-14, 2001.

BRUCE, W.F. *American Home Products Corp.*, U.S. 3.775.405, C.A. 80: 69593h; C.A.82:155791^A, 1974.

CLAYSON, D.B.; MEHTA, R. e IVERSON, F. Oxidative DNA damage- The effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. *Mutation Research*, v. 317, p. 25-42, 1994.

CLEMENT, B., DEMESMAEKER, M. Formation of Guanaxobenz from guanabenz in Human Liver. A new metabolic marker for CYP1A2. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 25, n. 11., p. 166-1271, 1997.

COLE, J.; SKOPEK, T.R. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutation spectra in the human population in vivo. *Mutation Research*, v. 304, p. 33-115, 1994.

DESIDERI, N.; SESTILLI, I.; MANARINI, S. Guanylhydrazones of 3-Substituted 2-Pyridinecarboxaldehyde and of (2-Substituted 3-Pyridinyloxy) Acetaldehyde as Prostanoid Biosynthesis and Platelet-Aggregation Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 4., p. 455-460, 1991.

DESIDERI, N.; SESTILLI, I.; PICCARDONI, P. Synthesis of Some Guanylhydrazones and Imidazolinyldiazones as Thromboxane-Synthase and Platelet-Aggregation Inhibitors. *Archives of Pharmacy*, v. 325, n. 12., p. 773-777, 1992.

DOAMARAL, J.R.; FRENCH, D.A.; BLANZ, E.J.; FRENCH, F.A. Antimalarial Activity of Guanylhydrazones of Haloaromatic Ketones .2., *Abstract American Chemistry*, v. 57, 1969.

DOAMARAL, J.R.; FRENCH, F.A.; BLANZ, E.J.; FRENCH, D.A. Antimalarial Activity of Guanylhydrazone Salts of Aromatic Ketones .2. Development of Active Polyhalo Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 9., p. 862, 1971.

FARBAIRN, D.W., OLIVE, P.L., O'NEILL, K.L. The Comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, v. 339, p. 37-59, 1995.

FENECH, M.; NEVILLE, S. Effect of cooked meat on micronucleus frequency. *Food and Chemical Toxicology*, v. 31, p. 337-714, 1993.

FOYE, W.O.; ALMASSIAN, B.; EISENBERG, M.S. Synthesis and Biological-Activity of Guanylhydrazones of 2-Pyridine and 4-Pyridine and 4-Quinoline Carboxaldehydes. *Journal Pharmacological Sciences*, v. 79, n. 6. , p. 527-530, 1990.

GADAD, A.K.; MAHAJANSHETTI, C.S.; NIMBALKAR, S.; RAICHURKAR, A. Synthesis and antibacterial activity of some 5-guanylhydrazone/thiocyanato -6-

arylimidazol [2,1-b]-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 35, p. 853-857, 2000.

GOSSNITZER, E.; FEIERL, G.; WAGNER, U. Synthesis, structure investigations, and antimicrobial activity of selected s-trans-6-aryl-4-isopropyl-2-{2-[(E)-1-phenylalkylidene]-(E)-hydrazino}-1,4-dihydropyrimidine hydrochlorides. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 15, n. 1., p. 49-61, 2002.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J.T.; GATEHOUSE, D.G.; ADLER, I.D.; BLAKEY, D.H.; DERTINGER, S.D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 234-252, 2000.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.; NEWELL, G.; SALAMONE, M. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity – A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. *Mutation Research*, v. 123, p. 61-118, 1983.

HEUSER, V.D., ERDTMANN, B., KIVTKO, K., ROHR, P., DA SILVA, J. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology*, v. 232, p. 235-247, 2007.

HOLZER, W.; GYORGYDEAK, Z. Acylation of guanylhydrazones derived from cyclic ketones: Synthesis of 3-acylamino-1-cycloalkenyl-5-methyl-1H-1,2,4-triazoles. *Heterocycles*, v. 48, n. 7., p. 1395-1406, 1998.

HOLZER, W.; GYORGYDEAK, Z. NMR Spectroscopic Investigations with Isatin Guanylhydrazones. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 33, n. 3., p. 675-680, 1996.

HOLZER, W.; GYORGYDEAK, Z.; KUNZ, R.W.; LINDEN, A. 1,4-diacyl-3-acylamino-5-aryl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazones – ring-closure products of aromatic carbaldehyde (diaminomethylene) hydrazones with acylating agents. *Monatshefte Chemistry*, v. 126, n. 6-7., p. 733-746, 1995.

HSU, T.C. Genetic instability in the human population. A working hypothesis. *Hereditas*, v. 98, p. 1-9, 1983.

JOSEPHY, P.D. *Molecular Toxicology*. Oxford University: New York: 1997.

KATZUNG, B.G., *Farmacologia Básica e Clínica*. 6^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KODAMA, J.K. *Shell Oil Co. U.S. 3.975.533, C.A..85: 130539y*, 1976.

KOROLKOVAS, A. *Development of drugs*. In: *Essential of Medicinal Chemistry*. Ed. Wiley J. & sons, Copyright, USA, p.53-145, 1988.

KORYTNYK, W.; ANGELINO, N.; DAVE, C. Guanylhydrazones with Potential Anti-leukemic Activity .2. Synthesis and Structure-Activity-Relationships of Analogs of 4,4-Diacetyl-N,N-Diphenylurea Bis (Guanylhydrazone). *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 6., p. 507-513, 1978.

KORYTNYK, W.; ANGELINO, N.; GHOSH, A.C., DAVE, C. Guanylhydrazones with Potential Anti-leukemic Activity. *Abstract American Chemistry Sciences*, p. 64, 1973b.

KORYTNYK, W.; GHOSH, A.C.; ANGELINO, N.; DAVE, C. Guanylhydrazones with Potential Anti-leukemic Activity .1. Aza Analogs of 4,4-Diacetyl-N,N-Diphenylurea Bis (Guanylhydrazone). *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 8, p. 959-961, 1973a.

KROPKO, M.L.; JAEN, J.C.; THEISS, J.C.; WOLD, S.; CAPRATHE, B.W.; WISE, L.D. Chemical purity and mutagenicity: Case study of a drug in development. *Mutation Research*, v. 281, p. 233-238, 1992.

KURZER, F.; GODFREY, L.E.A. Synthesen Heterocyclischer verbindungen aus aminoguanidin. *Angewandte Chemie*, v. 75, n. 23., p. 1157, 1963.

LE CURIEUX, F.; MARZIN, D.; ERB, F. Comparison of three short-term assays: results of seven chemicals, potencial contribution to the control of water genotoxicity. *Mutation Research*, v. 319, p. 223-236, 1993.

LOHMAN, P.H.M.; MENDELSON, M.L.; MOORE II, D.H.; WATERS, M.D.; BRUSICK, D.J.; ASHBY, J.; LOHMAN, W.J.A. A method for comparing and combining short-term genotoxicity test data: The basic system. *Mutation Research*, v. 266, p. 7-25, 1992.

LUNDSTEDT, T.; SKOTTNER, A.; SEIFERT, E.; LEK, P.; BOMAN, A. Methods and pharmaceutical compositions using guanabenz for the treatment of neurological damage. *PCT Int. Appl.*, 2006.

MADLE, S. e LANG, R., Assessment and Evaluation of Genotoxicity Findings. *Mutation Research*, v. 291, p. 87-91, 1993.

MALUF, S.W., ERDTMANN, B., Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, v. 471, p. 21–27, 2000.

MAMOLO, M.G.; VIO, L. Antihypertensive Agents .4. Aminoguanidine and Hydrazinopyrimidine Derivatives. *Farmaco- Edition Sciences*, v. 38, p. 255, 1983.

MAMOLO, M.G.; VIO, L.; BANFI, E.; CINCO, M. Synthesis and Antibacterial Activity of Aminoguanidine Derivates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 6., p. 467-474, 1986b.

MAMOLO, M.G.; VIO, L.; FABRIS, B.; FISCHETTI, F.; CARRETTE, R.; GIRALDI, T. Antihypertensive Activity of Arylidenaminoguanidine Derivates. *Farmaco-Edition Sciences*, v. 41, n. 11., p. 873-880, 1986a.

MANNINIPALENZONA, A.; SINIBALDI, P.; CAVRINI, V. Anti-viral Activity of Guanylhydrazones Effect of a Bis-derivative on Herpes-simples Virus-Infection In vitro. *Microbiologia*, v. 3, n. 3., p. 363-368, 1980.

MARTINS, T. L. C.; RAMALHO, T. C.; FRANCA, T. C. C.; FIGUEROAVILLAR, J. D. Synthesis of Guanylhydrazones under Microwave Irradiation. *Synthetic Communications*, v. 34, n. 21., p. 3891-3899, 2004.

MAVOURNINN, K.H; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C.; SALAMONE, M.F.; e HEDDLE, J.A., The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. *Mutation Research*, v. 239, p. 29-80, 1990.

MCKELVEY-MARTIN, V.J.; GREEN, M.H.L.; SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B.L.; DE MÉO, M.P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review. *Mutation Research*, v. 288, p. 47-63, 1993.

MCCMAHON, F.G.; RYAN, J.R.; JAIN, A.K.; VARGAS, R.; VANO, S.K. Guanabenz in essential hypertension. *Clinical Pharmacological and Therapeutics*, v. 21, n. 3., p. 272-277, 1977.

MESSEDER, J.C.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; TINOCO, L.W.; SOUZA, E.M.; SANTA RITA, R.; DE CASTRO, S.L. Aromatic guanyl hydrazones: Synthesis, structural studies and *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 5, n. 24., p. 3079, 1995.

MILLER, A.; PÖTTER-LOCHER, F.; SEELBACH, A.; STOPPER, H.; UTESCH, D.; MADLE, S., Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the *in vitro* Micronucleus test. *Mutation Research*, v.410, p. 81-116, 1997.

NISHIMUR, T.; YAMAZAKI, C.; TOKU, H. Antiviral Compounds .4. Synthesis and Anti-influenza Virus Activity of Amidinohydrazones. *Chemical Pharmacological*, v. 22, n. 10., p. 2444-2447, 1974.

PICADA, J.N. et al. O Estresse Oxidativo e as Defesas Antioxidantes In: SILVA, D.J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, p. 251-269, 2003.

PITARQUE, M.,V., A., NOSKO, M., PAVLOVA, S., PETKOVA,V., HIRVONEN, A., CREUS, A., NORPPA, H., MARCOS, R. Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. *Environmental Health Perspectives*, v. 110, p. 399–404, 2002.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. 904 p.

RICHTER, P.H.; WUNDERLICH, I.; SCHLEUDER, M.; KECKEIS, A. Amidinohydrazones in Drug Research 1. *Pharmazie*, v. 48, n. 2., p. 83-94, 1993.

RUDD, N.L.; HOAR, D.I.; GREENTREE, C.L.; DIMINIK, L.S.; HENNING, U.G.G. Micronucleus assay in human fibroblast: A measure of spontaneous chromosomal instability and mutagen hypersensitivity. *Environmental Molecular Mutagenesis*, v. 12, p. 3-13, 1988.

RUIZ, R.; AVIADO, M. Pharmacology of New Antimalarial Drugs –3-Guanylhidrazones. *Pharmacology*, v. 4, n. 1., p.45, 1970.

SAFFI, J.; HENRIQUES, J.P.P. Reparação de DNA em Células Eucarióticas. In: SILVA, D.J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, p. 271-304, 2003.

SALAMONE, M.F.; HEDDLE, J.A. The bone marrow micronucleus assay: Rationale for a revised protocol, In: FREDERICK, J. *Chemical Mutagens Principles and Method for their Detection*. v. 8, New York: Plenum Press, 1983, p. 11-149.

SANTOS-FILHO, O. A. *Modelagem Molecular da Interação de Guanil Hidrazonas Tripanocidas com B-DNA*. 1996. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 1996.

SANTOS-FILHO, O. A.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; ARAÚJO, M.T. Molecular modeling of the interaction of trypanocide guanyl hydrazones with B-DNA, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 7, n. 13., p. 97, 1997.

SAWATARI, K., NAKANISHI, Y., MATSUSHIMA, T. Relationships between Chemical Structures and Mutagenicity: A Preliminary Survey for a Database of Mutagenicity Test Results of New Work Place Chemicals. *Industrial Health*, v. 39, p. 341-345, 2001.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research*, v. 31, p. 9-15, 1975.

SHEER, D. Chromosome and cancer, In: FRANKS L.M.; TEICH N.M. *Introduction o the cellular and molecular biology of cancer*. London: Oxford University Press, p. 221-238, 1987.

SILVA, J.D.; FREITAS, T.R.O.D.; HEUSER, V.; MARINHO, J.R.; BITTENCOURT, F.; CERSKI, C.T.S.; KLIEMANN, L.M.; ERDTMANN, B. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutation Research*, v. 470, p. 39-51, 2000.

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

SUNDBERG, R.J.; DAHLHAUSEN, D.J.; MANIKUMAR, G.; MAVUNKEL, B.; BISWAS, A.; SRINIVASAN, V.; MUSSALLAM, H.A.; REID, W.A.; AGER, A.L. Cationic Antiprotozoal Drugs – Trypanocidal Activity of 2-(4'-Formylphenyl) Imidazol [1,2-a] Pyridinium Guanylhidrazones and Related Derivatives of Quaternary Heteroaromatic- Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 33, p. 298, 1990.

TICE, R.R. Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: BUTTERWORTH, B.E.; COKUM, L.D.; GUZMÁN-RINCÓN, J. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. New York: Plenum Press, p. 69-79, 1995.

TICE, R.R.; ORMISTON, B.G.; BOUCHER, R.; LUKE, C.A.; PAQUETTE, D.S. Environmental biomonitoring with feral rodent species. In: SANDHU, S.; WATERS,

M.D. *Application of Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures*. New York: Plenum Pres, p. 69-79, 1988.

TINOCO, L.W.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Study of the Interaction between Trypanocide 3-nitrobenzaldehyde Guanyl Hydrazone and Bovine Serum Albumin by Equilibrium Dialysis and NMR. *Spectrochimica Letters*, v. 32, n. 6., p. 941, 1999.

ULRICH, P.; GRADY, R.W.; CERMI, A. Trypanocidal Aromatic Bis (Guanylhrazones)-Substituent Effects. *Abstract American Chemistry Scienses*, v. 182, p. 76, 1981.

ULRICH, P.; GRADY, R.W.; CERAMI, A. *Drug Research*, v. 2, p. 219-228, 1982.

VILLELA, I.V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J.D.D. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: SILVA, D.J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, p. 145-163, 2003.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.; SILVEIRA, J.; DIAS, J.F.; HENRIQUES, J.A.P. and SILVA, j., Assessment of environmental stress by the micronucleus and cometa assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions (in press). *Mutation Research*, v. 00, p.00, 2007.

WERBEL, L.M.; HUNG, J.; MVNAMARA, D.; ORTWINE, D.F. 3-Aryl-7-Chloro-3,4-Dihydro-1,9 (2H, 19H) Acridinedione, 1-Hydrazone as potent Antimalarial Agents (1,2). *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 363-370, 1985.

<http://www.drugs.com/MTM/guanabenz.html>. Acessado em 20/12/2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)