

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
PPGBCM

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E GENOTÓXICAS EM DOIS DERIVADOS DE GUANILHIDRAZONAS

Valéria Rodrigues Pinhatti

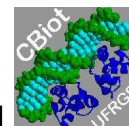
Orientadores: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques
Profª. Drª. Juliana da Silva

Porto Alegre

Junho/2009



Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul



Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
PPGBCM

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E GENOTÓXICAS EM DOIS DERIVADOS DE GUANILHIDRAZONAS

Valéria Rodrigues Pinhatti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques
Prof^a. Dr^a. Juliana da Silva

Porto Alegre

Junho/2009

Esse trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Laboratório de Genotoxicidade (GENOTOX- Instituto Royal).

Dedico este trabalho aos meus pais, Avelino e Valdeci, pelos valores e ensinamentos ao longo da vida. Ao Luis Felipe, pela imensa confiança, compreensão e amor. Nada seria possível sem o seu incentivo. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo Dom da Vida!

Ao orientador Prof. João Antônio Pêgas Henriques, por ter aceitado me orientar, por compartilhar comigo o seu vasto conhecimento e acima de tudo pelo exemplo de pesquisador comprometido com a fidedignidade do seu trabalho.

À minha orientadora, mestre, mãezona e amiga Prof. Juliana da Silva, responsável pelos meus primeiros passos na vida acadêmica e científica, agradeço toda confiança e dedicação ao longo destes anos. Serei eternamente grata.

Ao Prof. Tales Leandro Costa Martins pela ajuda inicial e pela realização das sínteses dos compostos empregados neste estudo.

À banca examinadora Prof^ª. Jaqueline Nascimento Picada, Temenouga Nucha Ghecheva, Prof. Guido Lenz e a Prof^ª. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini pela disposição de avaliar esta dissertação.

À Prof^ª. Jaqueline Nascimento Picada e a Prof^ª. Jenifer Saffi, membros da minha comissão de acompanhamento, pela colaboração e sugestões sobre o trabalho.

À amiga Dinara pelo exemplo de pesquisadora que tu és, por todos os ensinamentos, conselhos e pelos momentos compartilhados no laboratório, inclusive “aqueles”... E também os momentos divertidos fora do laboratório.

À minha amiga Albanin, pela ajuda, incentivo, sugestões, puxões de orelha e todo aquele “filtro social” que só você tem... Você me fez crescer muito.

Ao Angelo por ser um “mimo” de Guri Tchê! A Diana pelos momentos de “relax”, a Jaque Rocha por nossas conversas cruzadas, as Brunas muito “mimosinhas” e “queridinhas”.

Aos colegas do laboratório 410 da Ulbra: Aline, Fernanda, Mila, Martus, Juliane, Vinicius, Vivian, Meire e Letícia.

A todos os funcionários e professores do PPGBCM pela convivência e apoio especialmente à Sílvia Centeno, e o Luciano Saucedo pela amizade, e por estarem sempre dispostos a me ajudar com minhas inúmeras dúvidas.

A todos os colegas e amigos do Laboratório 210 do Departamento de Biofísica .

Às colegas do Laboratório de Genotoxicidade: Miriana, Márcia, Jaqueline, Isabel e Mirian, pela amizade e ótimos momentos de convívio dentro e fora do laboratório.

Aos colegas do laboratório 219 do Centro de Biotecnologia pela convivência.

A todos que de uma maneira ou outra, me auxiliaram e apoiaram na realização deste trabalho.

Obrigada.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
I INTRODUÇÃO	11
1. <i>Pesquisa e desenvolvimento de fármacos</i>	11
2. <i>Guanilhidrazonas</i>	13
2.1. <i>Características das guanilhidrazonas</i>	13
2.2. <i>Guanilhidrazonas e as suas ações terapêuticas</i>	14
3. <i>Estratégias experimentais</i>	17
3.1. <i>Teste Salmonella/microsoma</i>	17
3.2. <i>Organismo protótipo Saccharomyces cerevisiae</i>	18
3.3. <i>Mutagênese em Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.4. <i>Cultivo de células: ferramenta importante na biotecnologia</i>	21
3.5. <i>Uso das células V79 na genética toxicológica</i>	24
3.6. <i>Ensaio cometa</i>	25
3.7. <i>Teste de micronúcleos</i>	28
II OBJETIVOS	31
1. <i>Objetivo geral</i>	31
2. <i>Objetivos específicos</i>	31
III CAPÍTULO I	32
<i>ARTIGO A SER SUBMETIDO: Evaluation of the genotoxicity and biological activities of two guanylhidrazone derivatives</i>	32
IV DISCUSSÃO	68
1. <i>Citotoxicidade dos derivados de guanilhidrazonas</i>	68
2. <i>A genotoxicidade dos derivados de guanilhidrazonas</i>	69
3. <i>Estresse Oxidativo</i>	72
4. <i>Atividades Biológicas</i>	72
V CONCLUSÃO	74
VI PERSPECTIVAS	76
VII REFERÊNCIAS	77
ANEXO	92

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AP	Sítios apurínicos e apirimídicos
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSB	Quebras duplas no DNA (<i>Double strand breaks</i>)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
MMS	Metilmetano sulfonado
MN	Micronúcleos
PBS	Tampão salina-fosfato
SC	Meio completo para leveduras
V79	Células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês
FPG	Formamidopirimidina DNA glicosilase
ENDOIII	Endonuclease III
MGBG	Metilglioal-bis(guanilhidrazona)
SCGE	Eletroforese gel de célula única (<i>single cell gel eletroforesis</i>)
SSB	Quebras simples no DNA (<i>single strand breaks</i>)
<i>t</i> -BOOH	Hidroperóxido de <i>tert</i> -butila
T	Timina
2,3-DMeB	Cloridrato de (E)-2-[(2,3 dimetoxifenil) metileno] hidrazinocarboxi- midamida
3,4-DMeB	Cloridrato de (E)-2-[(3,4-dimetoxifenil) metileno] hidrazinocarboxi-midamida
4-NQO	Óxido de 4-nitroquinoleína

RESUMO

Nas últimas décadas a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, que sejam efetivos contra algumas patologias ainda sem tratamento adequado, e que possam substituir os existentes, porém a custos menores e dotados de menores efeitos adversos, tem impulsionado a comunidade científica a novas e incessantes pesquisas nesta área. Nesta direção compostos químicos derivados de guanilhidrazonas têm demonstrado promissores efeitos biológicos que possuem interesse farmacológico, uma vez que esse grupo apresenta representantes com atividade tripanocida e antifúngica contra *Candida albicans*. Na avaliação das atividades antifúngicas e anti-tripanosomas do cloridrato de (E)-2-[(2,3 dimetoxifenil) metileno] hidrazinocarboxi-midamida (2,3-DMeB) e do cloridrato de (E)-2-[(3,4-dimetoxifenil) metileno] hidrazinocarboxi-midamida (3,4-DMeB) os resultados mostram que o derivado de guanilhidrazona 2,3-DMeB têm uma atividade mais pronunciada. Os principais objetivos do presente estudo foram avaliar a citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade dos dois derivados de guanilhidrazonas, (2,3-DMeB) e (3,4-DMeB) em diferentes modelos biológicos. Os derivados 2,3-DMeB e 3,4-DMeB apresentaram um moderado efeito citotóxico em *Salmonella typhimurium* e na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ambos derivados induziram efeitos mutagênicos, em *S. cerevisiae*, na fase exponencial de crescimento. Com a proposta de elucidar a atividade genotóxica desses derivados, utilizou-se ensaio cometa (*single cell gel eletroforesis* – SCGE) nas condições alcalina e neutra, e o ensaio cometa modificado com as enzimas formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) e endonuclease III (ENDOIII) em células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (células V79). Ambos os derivados de guanilhidrazona induziram danos ao DNA somente em altas concentrações. O pós-tratamento com ENDOIII e FPG induziu um aumento significativo de danos oxidativos no DNA das células tratadas tanto com 2,3-DMeB quanto com 3,4-DMeB. Ambos compostos também induziram um aumento significativo na frequência micronúcleos em células V79 somente nas concentrações mais altas. Este conjunto de resultados das atividades biológicas de 2,3-DMeB e 3,4-DMeB podem estar relacionadas ao seu potencial oxidativo, ou ainda devido a uma possível interação com o DNA.

ABSTRACT

In the last decades, the need for development of effective new drugs against some pathologies for which there is no proper treatment and which can substitute the existing ones at lower cost and presenting less side effects have provoked the scientific community to new and steady research. Chemical compounds derived from guanylhydrazones have showed promising biological effects which present pharmacological interest once that group presents representatives with trypanicid and antifungal activity against *Candida albicans*. In the evaluation of the antifungal and anti-trypanosomiasis activities of hydrochloride (E)-2-[(2,3 dimethoxyphenyl) methylene] hidrazinocarboxi-midamida (2,3-DMeB) and hydrochloride (E)-2-[(3,4-dimethoxyphenyl) methylene] hidrazinocarboxi-midamida (3,4-DMeB) the findings show that the guanylhydrazones derivates 2,3-DMeB have a stronger activity. The main purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity of the two guanylhydrazones derivates in different biological models. The 2,3-DMeB and 3,4-DMeB guanylhydrazones induces weak cytotoxic effects in bacteria and yeast. In despite of the absence of mutagenic effects in *Salmonella thyphimurium*, in *Saccharomyces cerevisiae*, 2,3-DMeB and 3,4-DMeB was able to induced mutagenic effects, in exponentially growing cells. Genotoxicity of these compounds was also determined in V79 cells using alkaline and neutral comet assay, as well as modified comet assay with the bacterial enzymes formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG) and endonuclease III (ENDOIII). Both guanylhydrazone derivates induced DNA damage. Post-treatment of V79 cells with ENDOIII and FPG proteins induces a significant effect 2,3-DMeB and 3,4-DMeB-induced oxidative DNA damage. In addition they induced a significant increase in the frequency of micronucleated cells at higher doses. We have also evaluated the antifungal and anti-trypanosome activities of these guanylhydrazones derivates, and the results point to the more pronounced activities of 2,3-DMeB. At least in part, biological activities of 2,3-DMeB and 3,4-DMeB can be related to its oxidative potential, or even due to a possible DNA interaction action.

I INTRODUÇÃO

1. PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

O processo que envolve a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos vem crescendo notadamente nestes últimos anos e existe uma grande necessidade do desenvolvimento de novos compostos farmacologicamente ativos, que sejam eficazes contra diferentes patologias ainda sem tratamento, ou que possam substituir os existentes com custos reduzidos e também com um baixo efeito colateral. O problema fundamental neste processo de descoberta de um novo fármaco é a elevada taxa de reprovação nos ensaios clínicos, devido à baixa eficácia e a alta toxicidade. Para evitar que este problema, na fase dos ensaios clínicos, faz-se necessário que ocorram simultaneamente os processos de avaliação farmacocinética e toxicológica (Colombo & Perreto *et al.*, 2008).

O método de descoberta de fármacos baseado na modificação estrutural de moléculas já conhecidas leva à caracterização de novos compostos-protótipos que atuam pelo mesmo mecanismo farmacológico da molécula de origem. Esta estratégia é altamente empregada na indústria farmacêutica que pesquisa novos fármacos. No entanto, apenas a descoberta de novas substâncias bioativas, passíveis de representarem autênticas entidades químicas inovadoras, de possível aplicação terapêutica, é que caracteriza a inovação farmacêutica (Barreiro & Fraga, 2005).

O planejamento adequado de variações na estrutura de um composto bioativo pode resultar em derivados com maior interesse terapêutico, seja por apresentar maior atividade, menor toxicidade ou, ainda, por adquirir características farmacotecnicamente mais adequadas (Tavares, 2004).

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 do fármaco, tais como:

- (a) Metabolização: quando uma substância é introduzida em um organismo ela sofre metabolização, transformando-a estruturalmente gerando metabolitos que podem ter diversas atividades 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 & 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, resultantes do processo de síntese (Kropko *et al.*, 1992).

De acordo com a elucidação acima, pode-se sumarizar os objetivos da química medicinal como a compreensão das razões moleculares da ação dos fármacos. Envolvendo a relação entre atividade farmacológica e estrutura química dos mesmos, considerando os fatores farmacodinâmicos e farmacocinéticos que se traduzam em propriedades farmacoterapeuticamente úteis e, que, portanto represente um novo composto-protótipo, candidato efetivo a um novo fármaco (Viegas *et al.*, 2006).

2. GUANILHIDRAZONAS

2.1. Características das guanilhidrazonas

As guanilhidrazonas representam um grupo de compostos que compreende diferentes classes químicas, contendo grupos amidina (guanil) ligados ao grupo hidrazona (Walzer *et al.*, 1994; Mitchell *et al.*, 1998). Guanilhidrazonas são moléculas amplamente estudadas, biológica e quimicamente. Na química, são utilizados como intermediários na construção de compostos heterociclos polifuncionais contendo átomos de nitrogênio (Gossnitzer *et al.*, 2002). Entre o potencial biológico dessas moléculas, destacam-se as ações: depressora do sistema nervoso central, anti-hipertensiva, inibidora da agregação plaquetária, antitumoral, antileucêmica, antiviral, antibacterial, antimalarial, tripanocida, entre outras (para revisão ver Martins *et al.*, 2003; 2004). Um representante das guanilhidrazonas com interessante ação farmacológica é o Guanabenz (Wytensin®), um agonista do α -adrenoceptor usado como agente anti-hipertensivo (Holmes *et al.*, 1983).

Em relação à ação anti-tripanicida desses compostos, existe grande interesse na pesquisa e no desenvolvimento de novos derivados de guanilhidrazonas, em função da facilidade de síntese e baixo custo de produção, o que é extremamente apropriado para uso em países pobres, como a África, por exemplo, onde além de existir milhares de pessoas infectadas com tripanossomas, há também graves efeitos em rebanhos bovinos (Walzer *et al.*, 1994). Nos países tropicais, de forma geral também têm grande importância, devido ao aumento de mortalidade e morbidade. Na América Latina, estima-se uma incidência de 28 milhões de pessoas infectadas com *Trypanosoma cruzi*, uma das espécies do gênero *Trypanosoma* (WHO, 2005).

Desde a década passada, centenas de derivados de guanilhidrazonas foram sintetizados e a sua relação estrutura-atividade foi exaustivamente estudada, principalmente em relação a sua ação na tripanossomíase africana (Ulrich & Cerami, 1984; Sundberg *et al.*, 1990; Walzer *et al.*, 1994; Papanastasiou *et al.*, 2008). Além disso, também possuem uma interessante ação contra pneumocistose e os efeitos antitumorais dessas substâncias são notáveis (Walzer *et al.*, 1994; Andreani *et al.*, 2005).

2.2. Guanilhidrazonas e as suas ações terapêuticas

As drogas contendo o grupo guanidino têm sido alvo de intensa avaliação clínica e pré-clínica para o tratamento de tumores (Loesberg *et al.*, 1991; Troncone & Rufini 1997 Ekelund *et al.*, 2001a; Andreani *et al.*, 2004; 2006). O metilglioxal-bis (guanilhidrazona) (MGBG) é o composto protótipo dessa classe de agentes, com ação antitumoral (Chang *et al.*, 1978; Sundberg *et al.*, 1990; Ekelund *et al.*, 2001a). O MGBG foi sintetizado há mais de 20 anos por Wieland e colaboradores, sendo um cátion orgânico com um anel benzil lipofílico e, em pH fisiológico, com um grupo diamino positivamente carregado (Wieland *et al.*, 1980; Regenass *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 1999; Satoh *et al.*, 1999; Ekelund *et al.*, 2001a). A primeira evidência da ação antitumoral do MGBG em camundongos foi relatada em 1958, com aumento do tempo de vida de animais com leucemia L1210 tratados com concentrações milimolares dessa substância (Freedlander & French, 1958). Acredita-se que em relação à estrutura-atividade, o grupo guanidino é essencial para a ação citotóxica em células leucêmicas (Smets *et al.*, 1988). Em relação à toxicidade desse composto, os animais apresentam sintomas relacionados com cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e hipoglicemia irreversível (Janne *et al.*, 1991).

Os ensaios clínicos com MGBG iniciaram nos anos 60, entretanto, as ocorrências de efeitos colaterais continuaram sendo descritas. MGBG possui atividade antiproliferativa contra tumores de células não-pequenas de pulmão, carcinoma de esôfago e tumores de cabeça e pescoço (Mihich, 1963; Warrell & Burchenal, 1983). Atualmente é empregado em combinação com outros agentes quimioterápicos em protocolos para pacientes com linfomas (Warrell & Burchenal, 1983; Rizzo *et al.*, 1996; Levine *et al.*, 1997). Nesse sentido, muito esforço foi empregado na síntese de novos derivados com potencial farmacodinâmico e toxicidade reduzida, além da busca de estratégias terapêuticas que amenizem ou previnam os efeitos colaterais (Warrell & Burchenal, 1983; Hoefnagel *et al.*, 1987; Enblad *et al.*, 1996; Enblad *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 2007). Nessa direção, é importante mencionar que a toxicidade de MGBG em leveduras e células de mamíferos em cultura é abolida pelo tratamento com glutathione, vitamina E e vitamina C, indicando que a perturbação do estado redox celular é um dos mecanismos envolvidos na toxicidade dessa substância (Cheng *et al.*, 1990).

Em células em cultura, o tratamento com MGBG inibe a síntese de poliaminas intracelulares, tais como espermidina e espermina, e conseqüentemente reduz a síntese de

DNA e proliferação celular (Pegg & McCann, 1982; Marques *et al.*, 2007). Também afeta a função mitocondrial, inibe a oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, bloqueia a diamino oxidase intestinal, inibe a S-adenosilmetionina descarboxilase e induz apoptose, dependente de tempo e concentração, mas independente de p53 (Davidson *et al.*, 1998). Os seus derivados imidazólicos e compostos com anéis heteroaromáticos possuem importantes propriedades antimicrobianas e acredita-se que o mecanismo de ação envolva a ligação à fenda menor do DNA e inibição de topoisomerases (Shapiro & Englund, 1990; Mitchell *et al.*, 1998). Um dos achados mais interessantes nesse sentido é a habilidade de MGBG ligar-se ao DNA e induzir mutantes pequenas em *S. cerevisiae*, enquanto alguns derivados não interferem com a função mitocondrial e possuem reduzida toxicidade (Sundberg *et al.*, 1990; Brun *et al.*, 1996; Marques *et al.*, 2007).

Os efeitos antitumorais também são observados em modelos animais, e o tratamento é capaz de potencializar a ação de várias drogas. Estima-se que a concentração de H^+ pode aumentar de forma significativa a atividade citotóxica de várias drogas antitumorais convencionais. O composto *m*-Iodobenzylguanidine (MIBG), induz a acidificação *in vitro*, desta forma, potencializando os efeitos da cisplatina, mitomicina C, entre outras (Ekelund *et al.*, 2001a). Desta maneira a função citotóxica pode estar ligada diretamente ao pH tumoral, metabolismo de glicídios e inibição da captação de oxigênio pela cadeia respiratória via inibição do complexo I (Ekelund *et al.*, 2001a).

Outras guanilhidrazonas também são estudadas no contexto da ação antiproliferativa. Por exemplo, o derivado fenilglioaxal bis (guanilhidrazona) possui um efeito citotóxico mais proeminente que MGBG em células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês. O metilglioaxal bis (ciclopentanol) amidinohidrazona (MGBCP) inibe o crescimento de linhagens de células de osteosarcoma e carcinoma hepatocelular humano, tanto *in vitro* como *in vivo*, em razão da redução da síntese de poliaminas, induzindo apoptose (Regenass *et al.*, 1992; Ekelund *et al.*, 2001a). A guanilhidrazona tetravalente CNI-1493 inibe a ativação de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, por prevenção da fosforilação da p38 MAP-quinase (Kemeny *et al.*, 1998). Conforme Toninello e colaboradores (1999), os efeitos citotóxicos do MGBG podem ocorrer devido à inibição da respiração mitocondrial e a redução da produção de ATP. Com efeitos semelhantes às piridilcianoguanidinas, como a CHS828, induzem morte celular, devido à redução dos níveis de ATP, inibição da respiração mitocondrial, levando a uma diminuição da energia, causando uma fragmentação no DNA (Ekelund *et al.*, 2001a; Ekelund *et al.*, 2001b). Além disso, outras

guanilhidrazonas apresentam efeitos antiproliferativos associados a um bloqueio do ciclo celular, o que faz ocorrer um acúmulo de células na fase G2/M e leva a uma acentuada redução no potencial de membrana mitocondrial e uma diminuição no conteúdo de ATP intracelular (Andreani *et al.*, 2000 ; Andreani *et al.*, 2005; Andreani *et al.*, 2006). As guanilhidrazonas imidazo[2,1-b]tiazólicas também são agentes antitumorais potentes, com diversos estudos em relação a sua estrutura-atividade (Andreani *et al.*, 2005).

Considerando o amplo espectro de atividades biológicas dos derivados de guanilhidrazonas e o baixo custo de produção, Martins (2004) sintetizou uma série de derivados de guanilhidrazonas. Dentre estes, o cloridrato de (E)-2-[(2,3 dimetoxifenil) metileno] hidrazinocarboxi-midamida (2,3-DMeB), e o cloridrato de (E)-2-[(3,4-dimetoxifenil) metileno] hidrazinocarboxi-midamida (3,4-DMeB), demonstraram efeitos antibacterianos em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e efeitos antifúngicos em *Candida albicans* (Martins, 2004). A diferença entre estes dois derivados é a presença do grupo metoxila na posição 2 ou 4 no anel aromático (Figura 1).

Dessa forma, esse trabalho propõe-se a estudar a toxicidade genética de dois derivados de guanilhidrazonas 2,3-DMeB e 3,4-DMeB, uma vez que os ensaios de genotoxicidade e mutagênese são fundamentais para segurança no uso de fármacos e outros produtos bioativos. Em termos de derivados de guanilhidrazonas, a investigação é especialmente interessante, pois muitas dessas moléculas interagem com o DNA diretamente, inibem topoisomerasas, perturbam a homeostase tiólica e afetam vias de sinalização celular, e desta forma atuando em nível de fenômenos que repercutem na integridade da informação genômica (Walzer *et al.*, 1994; Kemeny *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1998; Ekelund *et al.*, 2001a). Além disso, o estudo comparativo entre as duas moléculas permite iniciar a coleção de informações para a elucidação da relação estrutura-atividade.

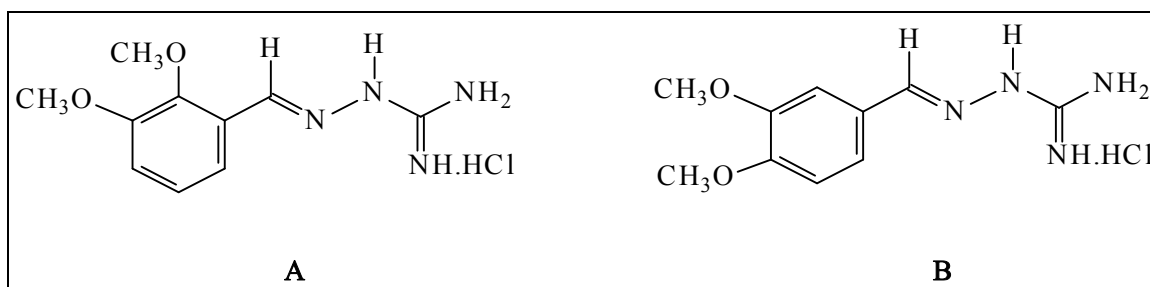


Figura 1. Derivados de guanilhidrazonas empregados nesse estudo:

- A. Cloridrato de (E)-2-[(2,3-dimetoxifenil) metileno] hidrazinocarboxi-midamida
- B. Cloridrato de (E)-2-[(3,4-dimetoxifenil) metileno] hidrazinocarboxi-midamida

3. ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS

3.1 Teste *Salmonella/microsoma*

O teste *Salmonella/microsoma*, desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores na década de 70 é um ensaio bacteriano de curta duração que busca identificar substâncias que causem danos genéticos e possam evoluir a mutações (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000). Este ensaio baseia-se na indução de mutações reversas em linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina que conduzem as mesmas à prototrofia.

Nas linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no teste *Salmonella/microsoma*, a resposta aos danos ao DNA é potencializada pela presença do plasmídeo pKM101, o qual permite a síntese translesão de DNA, levando, portanto, à mutagênese (Bhamre *et al.*, 2001). Estas linhagens ainda contam com outras mutações que também auxiliam a identificação de substâncias que lesam o DNA: mutação no gene *rfa*, que acarreta na perda parcial da barreira de polissacarídeos da parede bacteriana, aumentando a permeabilidade e facilitando a entrada de moléculas maiores na célula; deleção do gene *uvrA*, responsável pelo sistema de reparação por excisão de nucleotídeos do DNA, o que impede que esta via de reparação esteja atuante nestas linhagens, possibilitando a fixação das mutações (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Cada linhagem é mutada de forma diferente no operon da histidina, o que permite que tenham especificidade na detecção de um determinado tipo de mutágeno: (i) a linhagem TA98 detecta mutágenos que causam erro no quadro de leitura do DNA (“frameshift mutation”); (ii) a linhagem TA97 também apresenta regiões preferenciais para mutágenos que causam erro no quadro de leitura (“frameshift mutation”); (iii) a linhagem TA100 detecta mutágenos que causam substituição de pares de base do DNA; (iv) a linhagem TA102 detecta mutações de agentes que causam danos oxidativos e agentes indutores de pontes entre as cadeias do DNA (Maron & Ames, 1983; Huang *et al.*, 2007).

Em testes com procaríotos um componente importante é o sistema de indução microsomal, extraído de células de fígado de ratos pré-tratados com um indutor enzimático com a função de reproduzir o metabolismo de mamíferos, permitindo que também seja avaliada a ação genotóxica dos metabólitos dos agentes testados (Mortelmans & Zeiger, 2000). Além disso, já existem preparações da fração microsomal hepáticas

humanas disponíveis para o uso em testes de mutagênese (Hakura *et al.*, 2005). A combinação de testes com presença e ausência de sistema metabólico e linhagens bacterianas sensíveis a diferentes agentes possibilita determinar tanto substâncias com ação genotóxica direta como monitorar a atividade, positiva ou negativa, dos metabólitos gerados pela biotransformação.

O teste *Salmonella*/microssoma é o mais recomendado internacionalmente para avaliação do potencial mutagênico de substâncias provenientes das mais diversas fontes: alimentos, medicamentos e produtos biotecnológicos, efluentes industriais e poluentes ambientais (Chung *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 2004; Wogan *et al.*, 2004; Okamoto 2005; Abdelwahed *et al.*, 2008). Existe uma correlação importante entre os resultados do teste Ames e testes de carcinogênese em roedores (Shelby 1988; Mortelmans & Zeiger, 2000; De Coppi *et al.*, 2007). Além do teste em *Salmonella*, outros ensaios de genotoxicidade em procariotos também colaboram com contribuições valiosas para a toxicologia genética e áreas correlatas (Quillardet & Hofnung, 1993; Christen *et al.*, 1996; Reifferscheid & Heil, 1996; Mortelmans & Riccio, 2000; Adris *et al.*, 2007).

3.2 Organismo protótipo *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucariótico utilizado como modelo em estudos de processos fundamentais para todas as formas de vida, em razão da sua similaridade genética, bioquímica e funcional com mamíferos em vários aspectos (Menacho-Marquez & Murguia, 2007). Além disso, a *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o genoma completamente seqüenciado, tornando-se uma ferramenta extremamente importante para pesquisas do seqüenciamento de genes humanos e de outros eucariotos superiores (Goffeau *et al.*, 1996).

Desta forma, esse organismo é um protótipo útil para o melhor entendimento de diversas funções biológicas, principalmente na biologia do câncer, estudos de genética toxicológica e doenças humanas (Simon *et al.*, 2000; Boeira *et al.*, 2002; Kurtz *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2005). A *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada na indústria química e de alimentos, na indústria farmacêutica, com ênfase na produção de proteínas terapêuticas, incluindo proteínas humanizadas, vacinas e probióticos; e na tecnologia ambiental, com fins de bioremediação, tratamento de resíduos e recuperação do solo (para revisão ver, Lafon *et al.*, 2007; Menacho-Marquez & Murguia, 2007).

É um organismo unicelular, que apresenta um ciclo eucariótico típico, completo e bem definido, e ainda conta com vantagens como, genoma pequeno e crescimento rápido em condições adequadas, características estas, que fazem a levedura apropriada para estudos biológicos (Ausubel *et al.*, 1995).

A *S. cerevisiae* foi pioneira em estudos de interação gênica com uso de mutantes, interações proteína-proteína por meio do sistema duplo-híbrido e na compreensão de muitos eventos metabólicos que ocorrem nas organelas citoplasmáticas (Hartmann *et al.*, 2001; Goll & Uetz, 2006; Parrish *et al.*, 2006; Boone *et al.*, 2007; Merz *et al.*, 2007).

A levedura é geneticamente bem caracterizada, especialmente quanto à sua resposta a agentes causadores de danos ao DNA nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA, mecanismos que respondem ao estresse oxidativo e homeostase metálica (Maris *et al.*, 2001; Brendel *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2007).

3.3 Mutagênese em Saccharomyces cerevisiae

Os ensaios com leveduras têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias. Esses ensaios são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis, apresentando resultados confiáveis na identificação biológica. Além disto, a levedura possui um sistema endógeno de ativação metabólica constituído por um complexo enzimático (citocromo P-450) e detoxificação, sem a necessidade da adição de um sistema exógeno, sendo, desta forma, uma vantagem sobre os ensaios bacterianos (Toussaint & Conconi, 2006; Toussaint *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 2007). Para avaliação de toxicidade genética, experimentos de mutações reversas são os mais comumente utilizados. Eles se baseiam na compensação ou restauração de um erro gênico responsável por um requerimento nutricional (para revisão ver, Zimmermann & Vig, 1975). A restauração se deve a uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devido à uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos “nonsense”. A reversão de auxotrofia para prototrofia pode ser causada por uma substituição, inserção ou deleção de pares de bases ou por uma mutação induzida pelo supressor do gene mutante original. Para que seja identificada a mutação reversa é necessário a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como por exemplo, a linhagem haplóide XV185-14c (Zimmermann

et al., 1984; Henriques *et al.*, 1997; Rosa *et al.*, 2004). Esta linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações locus específicas: reversões do alelo ocre *lys1-1* ou do alelo “missense” *his1-7*, e reversões por deslocamento de quadro de leitura do DNA “frameshift” verificadas no locus *hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas pela semeadura em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo um “background” de crescimento.

As mutações são detectadas através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo do organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA, podendo assim ser divididas em dois grupos: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou estrutura dos cromossomos (Macgregor *et al.*, 2000; Dearfield *et al.*, 2002).

As alterações gênicas, que derivam de um tratamento mutagênico, podem ser facilmente quantificadas utilizando um marcador fenotípico, como por exemplo, a sensibilidade à canavanina. Diversas linhagens selvagens expressam um transportador de arginina chamado Can1p. A canavanina é um análogo estrutural tóxico da arginina (figura 2). O mesmo transportador que internaliza a arginina, faz a importação de canavanina do ambientes levando as células à morte. Desta maneira, as alterações no gene *CAN1*, induzidas por substâncias mutagênicas podem tornar as células resistentes aos efeitos tóxicos da canavanina, e assim, podendo aumentar a sobrevivência das células na presença de canavanina quando comparadas a tratamentos não mutagênicos (Brendel & Henriques, 2001; Huang *et al.*, 2003).

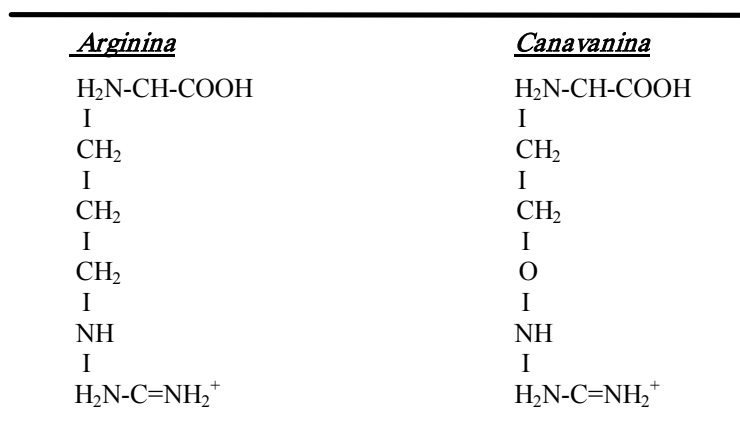


Figura 2. Estrutura química dos análogos arginina e canavanina.

3.4 Cultivo de células: ferramenta importante na toxicologia, farmacologia e biotecnologia

O cultivo de células constitui uma ferramenta de valor inestimável para pesquisa em diversos campos da área biomédica, facilitando a análise de propriedades biológicas e processos que não seriam facilmente realizados em nível de organismo intacto. Embora a primeira cultura de células animais tenha sido realizada com sucesso por Ross Harrison em 1907, até o final da década de 40 e início dos anos 50, essa metodologia ainda não tinha sido muito empregada pelos cientistas. O desenvolvimento de antibióticos, o uso de tripsina para remover as células aderentes e a padronização de meios de cultivo quimicamente definidos impulsionou essa tecnologia a partir dos anos 60. Nesse mesmo período, grandes empresas começaram a comercializar materiais plásticos para cultura de células, novos produtos para filtração, meios de cultura em pó e líquidos e câmaras de fluxo laminar. A manutenção de células em cultura sejam linhagens primárias ou imortalizadas, que cresçam aderidas a um substrato plástico ou em suspensão, requer conhecimento e prática de algumas poucas técnicas essenciais, pois se trata de um procedimento relativamente simples. Devido a essa praticidade, segurança e efetividade de ensaios, milhares de trabalhos utilizam esses sistemas experimentais (Doyle & Griffiths, 1999; Helgason & Miller, 2004; Zucco *et al.*, 2004).

Até a metade dos anos 80, a tecnologia da cultura de células não era extensivamente empregada em toxicologia. Grisham & Smith, em 1984, em um estudo financiado pela comissão européia fizeram essa interessante observação: “*Todo o potencial do sistema de cultivo de células de mamíferos para análise de toxicidade química ainda não está sendo executado na prática*”. Em verdade, somente após a segunda metade da década de 80, a toxicologia *in vitro*, como área científica, desenvolveu-se, com a criação e apoio da Sociedade Européia de Toxicologia *In vitro*, cujas atribuições eram regulares as pesquisas na área, delimitar as normas éticas desses processos e desenvolver novas metodologias. A toxicologia *in vitro* investiga o efeito tóxico e os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos usando células em cultura. Essa área do conhecimento desenvolveu diversas estratégias para abordagem mecanística do efeito de drogas em células cultivadas, o que melhorou consideravelmente testes e procedimentos de validação toxicológicos de diversas substâncias, explorando a base celular e molecular da toxicidade e estudando as modificações dos xenobióticos no ambiente celular. Os avanços na área,

com o desenvolvimento de coquetel de nutrientes em substituição ao soro bovino fetal, linhagens com capacidade de proliferação em meio sem soro, uso da fração microssomal hepática humana para metabolização de drogas *in vitro*, a diferenciação celular por meio de uso de fatores extracelulares, o melhoramento das interações célula a célula com uso de co-cultivo e o cultivo tridimensional permitiram grandes avanços no entendimento dos mecanismos de toxicologia nos anos subsequentes (para revisão ver, Zucco *et al.*, 2004; Debnath & Brugge, 2005).

Nos últimos anos, sistemas *in vitro* para avaliação de toxicidade em órgãos, com fins de determinação de nefro-, hemato-, neuro- e hepatotoxicidade, estão sendo desenvolvidos para aprimorar as investigações, facilitar a elucidação de mecanismos e minimizar a necessidade de estudos em animais. Nesse âmbito, diferentes tipos de procedimentos, com diversos graus de complexidade, podem ser aplicados, como por exemplo, perfusão de órgãos isolados, uso de fatias de tecidos, culturas primárias de tecidos e fracionamento subcelular. Enquanto no passado, muitos esforços foram realizados para isolamento da simples unidade viva, no presente, um dos principais objetivos é a reconstrução *in vitro* da complexidade *in vivo*, incluindo os vários estágios do desenvolvimento dos diferentes tipos celulares humanos na sua condição de ambiente tecidual, sua diferenciação, envelhecimento e morte. Muitas tentativas de simular em cultura, a barreira epitelial, intestinal e hemato-encefálica estão em andamento (para revisão ver, Feng 2002; Wise 2002; Zucco *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de técnicas de cultivo de células pluripotentes também está atraindo a atenção dos toxicologistas. Essa capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares é interessante para desenvolver ensaios *in vitro* para avaliação em curto prazo de teratogênese (Goodell, 2001). A toxicogenômica, tecnologia que analisa alterações na expressão gênica, usando arranjos de DNA e outras metodologias como a reação em cadeia da polimerase em tempo real, em resposta a exposição de uma certa substância também faz uso potencial das linhagens em cultivo para elucidação semi-quantitativa dos genes envolvidos na resposta tóxica. Nesses sistemas, a expressão de mais de dez mil genes pode ser analisada simultaneamente em um arranjo simples (Helgason & Miller, 2004; Zucco *et al.*, 2004; Ahuja *et al.*, 2007). No campo da genética toxicológica, os ensaios em células em cultura permitem avaliar as lesões ao DNA assim como o potencial mutagênico e recombinogênico de qualquer substância com facilidade, rapidez, segurança e boa correlação aos resultados em estudos *in vivo*. De fato, os

resultados obtidos nesses sistemas *in vitro* direcionam os ensaios *in vivo*, gerando bases racionais para a avaliação da necessidade do ensaio, a escolha do modelo animal mais adequado e o teste a ser empregado, para predição teórica dos resultados e o mecanismo envolvido. No entanto, o alto nível de diferenças inter-espécies em processos metabólicos, não permite que os dados obtidos em animais possam ser extrapolados para humanos com certeza absoluta. Para isso, a comparação entre os resultados obtidos em animais e os resultados em células humanas em cultura, cuja disponibilidade aumentou consideravelmente na última década, pode providenciar bases para a seleção do ensaio em modelo animal mais adequado para testes de toxicidade de longa duração (Zucco *et al.*, 2004; Walmsley 2005).

As linhagens celulares humanas possuem uma particular importância em pesquisas utilizando abordagem de genética reversa, no estabelecimento de modelos *in vitro* de doenças humanas e também na investigação de mecanismos farmacodinâmicos de moléculas potencialmente bioativas (Allen *et al.*, 2005; Horscroft *et al.*, 2005; Goldbard 2006; Gottfried *et al.*, 2006). O isolamento e padronização de linhagens tumorais humanas é a base da pesquisa científica na busca de novos agentes antiproliferativos para terapia antitumoral. Embora as linhagens celulares humanas tenham certo destaque na área, as linhagens derivadas de roedores, como os fibroblastos de pulmão de hamster chinês, ovários de hamster chinês, queratinócitos de camundongo, hepatócitos murinos, e de primatas, como os fibroblastos de rim de macaco (linhagem Vero), apresentam-se como primeira escolha nas investigações em razão de segurança, uso e condições de cultivo bem estabelecidos e de seus padrões genéticos e fisiológicos conhecidos (Bradley *et al.*, 1981; Doyle & Griffiths, 1999; Zucco *et al.*, 2004).

O cultivo de células também é importante para o desenvolvimento de terapias celulares na medicina regenerativa envolvendo células tronco, transplantes autólogos e engenharia de tecidos; na virologia; aconselhamento genético por meio de amniocentese e cultivo das células fetais para diagnóstico genético e também possui imenso interesse biotecnológico (para revisão ver, Tanioka *et al.*, 2006; Van Noort, 2006; De Coppi *et al.*, 2007).

3.5 Uso das células V79 na genética toxicológica

Os ensaios de mutagênese empregando células de mamífero em cultura datam de 1968 e as primeiras linhagens celulares utilizadas para esse propósito foram os fibroblastos de pulmão de hamster chinês, conhecida como linhagem V79, e as células de ovário de hamster chinês (CHO) (Bradley *et al.*, 1981).

As células V79 possuem interessantes propriedades para ensaios de toxicologia genética: fácil cultivo e manutenção; crescimento rápido e curto período de adaptação; tempo de geração entre 12 e 16 horas e capacidade de iniciar um rápido crescimento exponencial a partir um pequeno inoculo. Além disso, possuem uma elevada eficiência de clonagem, em torno de 75-95%, pertencem ao gênero masculino e apresentam cariótipo estável (22 ± 1) (Bradley *et al.*, 1981). Essas células recuperam-se rapidamente após estoque em nitrogênio líquido, o que permite criopreservação sem afetar as características celulares e comprometer os ensaios, graças à baixa frequência de mutação espontânea (Bradley *et al.*, 1981).

De tal forma, o emprego das células V79 em estudos de genotoxicidade é indiscutível. Para avaliação de lesões ao DNA utiliza-se principalmente o ensaio cometa enquanto para avaliação de potencial mutagênico, utilizam-se os ensaios de mutação empregando o locus da hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase ou da bomba de sódio e potássio. Uma pequena porcentagem de trabalhos avalia mutação utilizando mutações auxotróficas e prototróficas, mutações que conferem sensibilidade a temperatura e mutações medidas pela resistência a várias drogas. O ensaio de micronúcleo é empregado para avaliar quebras cromossômicas, sendo que essas células também são a primeira escolha para a utilização do teste de aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs (Kalweit *et al.*, 1999; Von Der Hude *et al.*, 2000).

Os elementos básicos de estrutura e reparação de DNA nas células V79 são similares, mas não idênticos, aos de células humanas. De tal forma, as conseqüências da interação química de xenobióticos com o DNA, sejam de células humanas, sejam de células V79 são similares. Portanto, os resultados obtidos em células V79 são extremamente relevantes para humanos, sendo inclusive mais importantes que a extrapolação dos dados obtidos em procaríotos (Bradley *et al.*, 1981). Além disso, as células V79 podem ser adaptadas para uso com sistemas de ativação metabólica, simulando o metabolismo *in vivo* para detecção de pró-mutágenos (Scheuenpflug *et al.*,

2005). Novas metodologias para ensaios de transformação celular têm sido desenvolvidas para permitir ensaios de promoção tumoral em células V79, com especial atenção para detecção de carcinógenos não-genotóxicos (Sakai *et al.*, 2002).

As células V79 tem sido amplamente empregadas em estudos de diversas áreas, como estresse oxidativo (Moura *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2008; Viau *et al.*, 2009), mutagênese e reparação de DNA (Speit *et al.*, 2007; Bezerra *et al.*, 2008; Miorelli *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2009), mecanismos da morte celular programada (Grosicka *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007) e metabolismo (Miyagoshi & Fujikawa-Yamamoto, 2006; Rosa *et al.*, 2007).

3.6 Ensaio cometa

O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese de células únicas em gel, é amplamente empregado para avaliar dano ao DNA e reparação em células eucarióticas. A popularidade desse teste deve-se a sua sensibilidade, custo relativamente baixo e simplicidade. Além disso, o teste pode ser realizado em uma suspensão celular contendo uma população pequena de células, em proliferação ou não, e corresponde a um teste citogenético (Collins *et al.*, 1997 Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2001; Collins, 2004).

O princípio desse interessante ensaio leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização no núcleo celular. Para a realização do ensaio, as células são embebidas em agarose, suas membranas são rompidas com uso de detergentes em pH alcalino e as proteínas nucleares são removidas com uso de altas concentrações salinas. Dessa maneira, em lâmina resta apenas o nucleóide que permanece íntegro. Quando a lâmina é submetida ao campo elétrico, o DNA do nucleóide migra no gel de acordo com seu tamanho. Os fragmentos pequenos migram com uma velocidade maior que a matriz nuclear. Assim sendo, células com DNA danificado formam, após a migração, um aspecto de um cometa e a extensão da migração correlaciona-se diretamente com a quantidade de dano ocorrido (Tice *et al.*, 2000; Lee & Steinert, 2003; Collins 2004; Burlinson *et al.*, 2007).

Esse teste é uma avaliação de genotoxicidade, o qual detecta danos primários ao DNA induzidos por uma série de agentes químicos, como agentes intercalantes, alquilantes e oxidantes (Collins, 2004). Os danos detectados são principalmente quebras simples e

duplas na fita de DNA, eventos de reparo por excisão incompletos, sítios álcali-lábeis, danos oxidativos ao DNA, ligações cruzadas entre moléculas de DNA, entre DNA e proteínas e entre DNA e xenobióticos (Tice *et al.*, 2000; Bolognesi *et al.*, 2004). Embora seja possível quantificar o dano, não é possível identificar com clareza qual desses eventos foi responsável pela indução da lesão. Basicamente existem dois protocolos principais para a execução do teste: a versão neutra, conforme o método original aprimorado por Ostling e Johanson em 1984, que utiliza eletroforese em tampão de pH entre 7,0 e 8,0, a qual detecta quebras duplas nas fitas de DNA e ligações cruzadas DNA-DNA, DNA-proteína, DNA-xenobiótico (Ostling & Johanson, 1984); a versão alcalina realiza eletroforese em pH maior que 13,0, desnaturando o DNA, e podendo detectar quebras simples e duplas, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão incompletos e as ligações cruzadas. A versão alcalina é mais empregada por ser mais abrangente, pois além de detectar danos diretos, torna possível a avaliação de danos indiretos como lesões por metilação e adutos, os quais sendo álcali-lábeis, expressam-se com quebras simples frente ao tratamento alcalino. Além disso, pode-se ainda utilizar o protocolo levemente alcalino, cuja eletroforese acontece em pH 12,1 e assim não detecta danos álcali-lábeis (Tice *et al.*, 2000).

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas por esse teste podem ser reparadas (Collins, *et al.*, 1997; Tice *et al.*, 2000). A análise dos resultados pode ser realizada visualmente em microscópio ótico quando as células forem coradas com nitrato de prata ou em microscópio de fluorescência, quando coradas com brometo de etídeo, laranja de acridina ou DAPI. As células são classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação a cabeça (núcleo) em 4 classes de danos: classe 0: sem cauda (sem dano); classe 1: com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2: com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3: com uma cauda longa, superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 4: cauda longa e espalhada em forma de leque. O teste ainda permite inferir fragmentação apoptótica de DNA, em células cujo nucleóide não se mostra denso e apresenta-se difuso, ao contrário da célula sem dano, em que o material nuclear está compacto (Olive & Banath, 2006).

Esse teste pode ser realizado tanto *in vitro* como *in vivo*, em diversos tipos celulares, incluindo fungos, vegetais e células animais; um grande interesse existe no cometa *in vivo* em animais com fins de detecção de lesões ao DNA em diferentes órgãos de

animais (Rosa *et al.*, 2007a; Rosa *et al.*, 2007b; Cavalcanti *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2008). Algumas metodologias ainda permitem avaliar as lesões em tecidos incluídos em parafina, criopreservados e de forma *ex vivo*, em fatias de tecidos de animais (Plazar *et al.*, 2007). Dessa maneira, o ensaio cometa também é amplamente empregado em biomonitoramento humano e ambiental utilizando diversos organismos (Guecheva *et al.*, 2001; Villela *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008). Em termos de terapêutica, o ensaio é bastante empregado na avaliação da formação de pontes intercadeias em linfócitos de pacientes em tratamento com quimioterápicos e pacientes portadores de síndromes genéticas, em âmbito de pesquisa básica assim como na determinação da capacidade de reparo de DNA em pacientes com diversos tumores (Almeida *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2006). Além disso, programas de computador foram desenvolvidos para aperfeiçoar a análise de resultados e permitir a quantificação exata do conteúdo de DNA na cabeça e cauda, tanto em protocolos empregando corantes fluorescentes como em experimentos utilizando coloração com prata. Atualmente a análise automatizada tem sido utilizada exponencialmente em trabalhos empregando o ensaio cometa, embora a análise visual seja extremamente válida (Burlinson *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2007).

Evidências de morte celular por necrose e apoptose podem ser detectadas com alguns aprimoramentos do ensaio cometa, uma vez que esse ensaio é especialmente sensível para detecção de células em necrose e apoptose. Essa característica deve-se ao fato da fragmentação apoptótica de DNA poder conduzir a uma superestimativa do dano ao DNA induzido por genotoxinas e a necrose resultar em uma subestimativa da capacidade de reparo de DNA. Além disso, as modificações bioquímicas que ocorrem durante a morte celular podem ser discriminadas no ensaio cometa com uso de corantes e anticorpos específicos (Morley *et al.*, 2006). O ensaio de difusão de DNA em gel de agarose também auxilia nessa diferenciação (Zeljezic *et al.*, 2006).

O ensaio cometa fornece uma informação um pouco limitada a respeito do dano ao DNA, uma vez que não é possível distinguir entre os efeitos diretos do agente genotóxicos e os efeitos indiretos, como o dano oxidativo. Entretanto, nesse caso, o tratamento dos nucleóides com enzimas de reparação de DNA antes da eletroforese permite a identificação do tipo de dano específico causado, o que torna esse ensaio uma poderosa ferramenta na elucidação dos mecanismos genotóxicos (Gedik *et al.*, 1998; Sauvaigo *et al.*, 2002; Giovannelli *et al.*, 2003). As enzimas mais empregadas estão envolvidas na remoção de danos oxidativos, como a endonuclease III (Endo III) e a formamidopirimidina DNA

glicosilase (Fpg), que detectam pirimidinas oxidadas e purinas, respectivamente (Medina *et al.*, 2008; Viau *et al.*, 2009).

Vários pesquisadores trabalham no aprimoramento do ensaio cometa, tanto nos parâmetros que influenciam na técnica como na análise dos resultados, especialmente no desenvolvimento de novos programas analisadores de imagens. Uma das preocupações existentes no método baseava-se no fato de algumas quebras da fita serem reparadas e algumas lesões ainda não estarem excisadas durante o intervalo de tempo existente até a lise celular. Para contornar esse pequeno desvio do método, as células eram incubadas em presença de extrato nuclear para permitir a excisão completa de adutos de DNA e assim permitir a quantificação do dano total ao DNA. Essa é uma das inovações do método que aumenta muito a sua sensibilidade (Wang *et al.*, 2005).

3.7 Teste de micronúcleos

As anormalidades na estrutura do cromossomo são uma consequência direta do dano em nível de DNA. Por exemplo, as quebras cromossômicas podem resultar de quebras duplas de DNA não reparadas e os rearranjos cromossômicos, do reparo incorreto de quebras na fita de DNA. A perda de cromossomos e os erros de segregação são eventos importantes na carcinogênese, causados principalmente por defeitos na formação do fuso, centrômero e como consequência de alterações na condensação da cromatina antes da metáfase (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2006; 2007). Nas técnicas citogenéticas clássicas, os cromossomos são estudados diretamente pela observação de aberrações nas metáfases. Entretanto, essa abordagem, embora mais detalhista, é bastante complexa e trabalhosa. Desse modo, o desenvolvimento de um sistema simples para avaliação do dano cromossômico foi necessário. A resposta para o problema foi proposta independentemente por Schmid e Heddle: acessar o dano cromossômico *in vivo* pela medida do micronúcleo, também conhecido pelos hematologistas como corpos de Howell-Jolly em linfócitos, em populações de células em divisão. O ensaio de micronúcleo é hoje um dos testes citogenéticos *in vivo* mais bem estabelecidos no campo da genética toxicológica, com validação internacional e aplicável a qualquer população celular nucleada (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2006; 2007).

As quebras cromossômicas que não possuem centrômero não podem ligar-se às fibras cinetocóricas e conseqüentemente, não podem migrar para os pólos opostos da

célula juntamente com os demais cromossomos durante a anáfase. Na telófase, tanto da mitose quanto meiose, a membrana nuclear é refeita ao redor do conjunto de cromossomos, situados em pólos opostos da célula. Os fragmentos acêntricos ou até mesmo um cromossomo inteiro que não estava ligado ao fuso mitótico é incapaz de integrar-se aos novos núcleos. Em razão disso, esses fragmentos forma um pequeno núcleo individual, denominado micronúcleo, o qual é detectado em células interfásicas como um pequeno corpúsculo arredondado de cromatina, separado do núcleo principal (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2006; 2007). O micronúcleo indica um índice de quebras cromossômicas permanentes e perda cromossomal, pode ser detectado em células que tenham completado ao menos uma divisão celular e é desejável que seja avaliado no estágio de células binucleadas (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2006; 2007). Ocasionalmente, pontes nucleoplásmicas entre os núcleos também podem ser observadas e frequentemente correspondem a cromossomos dicêntricos em que os centrômeros foram puxados para pólos opostos da célula, constituindo assim em um indicativo de rearranjo cromossômico. O teste de micronúcleos, portanto, detecta em eucariotos mutagênese cromossômica do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico, detectando aberrações numéricas e cromossômicas. O micronúcleo aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes. Por isso, para visualizar micronúcleos, as células precisam ter passado por um ciclo mitótico (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2006; 2007).

Para a execução da técnica de micronúcleo, a população celular deve dividir-se e a cinética dessa divisão celular deve ser bem estabelecida. Considerando que as células de uma população não se dividem ao mesmo tempo, várias abordagens foram desenvolvidas para facilitar a execução do teste. Uma das mais conhecidas é o teste de micronúcleo com bloqueio na citocinese. Nessa variação do teste, as células que completaram uma divisão nuclear são tratadas com citocalasina B, um inibidor da polimerização da actina, necessária para formação dos microfilamentos que constriem o citoplasma entre os núcleos filhos durante a citocinese, permitindo que as células em divisão sejam rapidamente identificadas pelo aspecto binucleado. O uso da citocalasina B possibilita o acúmulo das células em divisão no estágio binucleado na população, independente da sincronização e proporção de células em divisão (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2006; 2007).

Algumas inovações foram realizadas na técnica ao longo desses 20 anos, e atualmente o teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese é um método útil para

medida de quebras cromossômicas, perda cromossômica, não disjunção cromossômica, necrose, apoptose e efeito citostático (Fenech, 2000). Em combinação com uso de sondas para a região do centrômero ou anticorpos contra o cinetócoro é possível distinguir entre quebra cromossômica e perda como mecanismo de formação do micronúcleo e assim medir defeitos na segregação dos cromossomos entre os núcleos na célula binucleada. A amplificação gênica também pode ser determinada por meio da visualização de brotos de material nuclear, observados nessa técnica (Fenech, 2007). Em razão dessas características, o conceito desse teste como um ensaio “citoma” de determinação de instabilidade cromossomal tem sido sugerido. O conceito “citoma” deve-se ao fato de cada célula do sistema estudado ser avaliada citologicamente em relação ao seu estado de viabilidade (necrose, apoptose), seu estado mitótico (mononucleada, metáfase, anáfase, binucleada ou multinucleada) e a instabilidade cromossomal ou danos (presença de micronúcleo, pontes nucleoplásmicas entre as células binucleadas, broto nuclear e inclusive o número de sinais de sondas centroméricas entre os núcleos da célula binucleada) (Fenech, 2006;2007).

Os micronúcleos podem ser formados como consequência da ação de agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a quebra de cromossomos (clastogênicos), levando a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos). Estes são, portanto, mutagênicos. A principal vantagem do teste é basicamente a simplicidade do teste, sendo de fácil execução, e o fato de ser de fácil análise permite que um grande número de células possa ser analisado em um curto espaço de tempo (Mateuca *et al.*, 2006).

II OBJETIVOS

1. *Objetivo geral*

A proposta do presente trabalho foi realizar a investigação das atividades biológicas e genotóxicas de dois derivados de guanilhidrazonas o 2,3-DMeB e o 3,4-DMeB.

2. *Objetivos específicos*

- ✓ Analisar o potencial mutagênico dos derivados de guanilhidrazonas em procariotos, utilizando o teste Salmonella/microsoma (Ames);
- ✓ Investigar o potencial mutagênico dos derivados em linhagens haplóides da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ Determinar as concentrações citotóxicas desses derivados para células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês em cultura (linhagem V79) por meio do ensaio de sobrevivência clonogênica;
- ✓ Investigar o potencial dos derivados em induzir danos ao DNA em células V79 em uma ampla faixa de concentrações por meio do ensaio cometa em condições de pH alcalino e neutro;
- ✓ Avaliar a habilidade dos derivados em causar danos oxidativos ao DNA por meio do ensaio cometa modificado, empregando endonucleases de reparação de danos oxidativos;
- ✓ Realizar a determinação do potencial mutagênico desses derivados em células V79 usando o teste de micronúcleo;
- ✓ Avaliar a atividade antifúngica e anti-tripanosoma desses derivados.

III - CAPÍTULO I

Evaluation of the genotoxicity and biological activities of two guanylhydrazone derivatives

(Artigo a ser submetido)

Evaluation of the genotoxicity and biological activities of two guanyldiazone derivatives

Valéria Rodrigues Pinhatti¹, Juliana da Silva², Tales Leandro Costa Martins³, Dinara Jaqueline Moura¹, Renato Moreira Rosa², Izabel Villela¹, Cheila Denise Ottonelli Stopiglia^{4,5}, Selma da Silva Santos⁵, Maria Lúcia Scroferneker⁴, Carlos Renato Machado⁵, Jenifer Saffi^{1,2} and João Antonio Pêgas Henriques^{1,2,7*}

¹Centro de Biotecnologia e Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Laboratório de Genética Toxicológica – Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Departamento de Química, Universidade Federal do Pampa, Bagé, Brazil.

⁴ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁵ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁶ Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁷ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Corresponding author

Departamento de Biofísica- Prédio 43422- Laboratório 210

Campus do Vale – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Bento Gonçalves 9500, Bairro Agronomia, CEP 91501-970

Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: +55 51 33166069, Fax: +55 5133167003

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

Abstract

Many studies have reported that guanylhyazones displayed a variety of biological activities, such as antihypertensive, antibacterial, antimalarial, anti-pneumocystoses and anti-trypanosomiasis, anti-tumor promoting, and significant cytotoxic activity against cancer cell lines. In this work we evaluated the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of the two guanylhyazone derivatives, hydrochloride (E) -2 - [(2,3 dimethoxyphenyl) methylene] hidrazinocarboxi-midamida (2,3-DMeB) and hydrochloride (E) -2 - [(3,4-dimethoxyphenyl) methylene] hidrazinocarboxi-midamida (3,4-DMeB) in different biological models. The 2,3-DMeB and 3,4-DMeB guanylhyazones induce weak cytotoxic effects in bacteria and yeast. In despite of the absence of mutagenic effects in *Salmonella thyphimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*, 2,3-DMeB and 3,4-DMeB were able to induced mutagenic effects, in exponentially growing cells. Genotoxicity of these compounds was also determined in V79 cells using alkaline and neutral comet assay, as well as modified comet assay with the bacterial enzymes formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG) and endonuclease III (ENDOIII). Both guanylhyazone derivatives induced DNA damage. Post-treatment of V79 cells with ENDOIII and FPG proteins induced a significant effect 2,3-DMeB and 3,4-DMeB-induced oxidative DNA damage. In addition they induced a significant increase in the frequency of micronucleated cells at higher doses. We have also evaluated the antifungal and anti-trypanosome activities of these guanylhyazone derivatives, and the results point to more pronounced activities of 2,3-DMeB. At least in part, biological activities of 2,3-DMeB and 3,4-DMeB can be related to its oxidative potential, or yet due a possible DNA interaction.

Keywords: genotoxicity; citotoxicity; *Saccharomyces cerevisiae*; V79 cells; guanylhyazone derivatives; biological activities.

1. Introduction

Guanyldiazones are widely studied molecules with interesting chemical and biological properties. The common feature of the guanyldiazones, as well as biguanidines, is the presence of amidine groups attached to aliphatic or aromatic structures (Mitchell *et al.*, 1997). The guanyldiazones contain the amidine (guanyl) group attached to the diazone group (Walzer *et al.*, 1994; Mitchell *et al.*, 1997).

The synthesis of these substances is a very easy process therefore present a low cost of production (Martins *et al.*, 2004). In this sense, research and development of guanyldiazones derivatives with therapeutical action is relevant. Besides, they have an important role as intermediate in the synthesis of heterocyclic polyfunctional compounds contain nitrogen (Gossnitzer *et al.*, 2002). During the last decades, hundreds of derivatives of guanyldiazones have been synthesized and their structure-activity relation have been studied (Gelbart and Thomas, 1978; Desideri *et al.*, 1992; Walzer *et al.*, 1994; Cerri *et al.*, 1997; Andreani *et al.*, 2005).

Many studies have reported that guanyldiazones displayed a variety of biological activities, such as, antihypertensive, antibacterial, antimalarial, anti-pneumocystical and anti-trypanosomiasical action (Gelbart and Thomas, 1978; Desideri *et al.*, 1992; Cerri *et al.*, 1997; Andreani *et al.*, 2005). One guanyldiazone with interesting pharmacological action is Guanabenz (Wytensin[®]), an active central α_2 -adrenoceptor agonist used as an antihypertensive agent (Holmes *et al.*, 1983).

Moreover, drugs containing guanidine group has been targets of intense clinical evaluation for antitumoral therapy (Ekelund *et al.*, 2001; Andreani *et al.* 2006; Andreani *et al.* 2008; Jobson *et al.*, 2008). These guanidine compounds have gained interest due to their antiproliferative activity. One of these compounds is methylglyoxal-bis(guanyldiazone) - MGBG, that is a potent inhibitor of the biosynthesis of the

polyamines spermidine and spermine (Eklund *et al.* 2001). The polyamines are small cations that are critically involved in many biological processes, in particular the regulation of cell proliferation and macromolecular synthesis through stabilization of DNA and methylation of tRNA (Carruthers *et al.* 2007). The MGBG also has been suggested to exert cytotoxic effect by inhibition of mitochondrial respiration and consequent reduction of ATP production (Toninello *et al.*, 1999). With similar effects, *m*-Iodobenzylguanidine (MIBG) and *N*-(6-(4-chlorophenoxy)hexyl)-*N*9-cyano-*N*0-4-pyridylguanidine (CHS 828) induce cell death due, in part, to the early and rapid decrease of ATP levels, secondary to inhibition of mitochondrial respiration leading to inhibition of energy dependent activation of caspase-mediated DNA fragmentation (Eklund *et al.*, 2001a; Eklund *et al.*, 2001b). Besides, other guanylhydrazones have its antiproliferative effect associated with a block in cell cycle progression, with cell accumulation in the G2/M phase and with a marked reduction in the mitochondrial transmembrane potential and a decrease in the intracellular ATP content (Andreani *et al.*, 2000; Andreani *et al.*, 2005; Andreani *et al.*, 2006).

In addition, also related to antitumoral effects, the Steroid FG, a funtumine derivative substituted with a guanylhydrazone moiety, is able to induce senescence and telomere shortening in tumoral cells (Brassart *et al.*, 2007), and more recently, the novel bis-guanylhydrazone [4,4'-diacetyldiphenylureabis(guanylhydrazone) guanylhydrazone] has been described as potent and selective inhibitor of Chk2p, a protein kinase involved in the ATM-dependent checkpoint pathway (Jobson *et al.*, 2008).

Considering the wide range of guanylhydrazones derivatives their biological activities and low cost of production, Martins (2004) synthesized a series of guanylhydrazone derivatives. Among these, the hydrochloride (E) -2 - [(2,3-dimethoxyphenyl) methylene] hidrazinocarboxi-midamida (2,3-DMeB), and the hydrochloride (E) -2 - [(3,4-dimethoxyphenyl) methylene] hidrazinocarboxi-midamida

(3,4-DMeB), showed antibacterial effects. The difference between these derivatives is the presence of methoxyl group at the 2 or 4 positions in aromatic ring (Fig. 1).

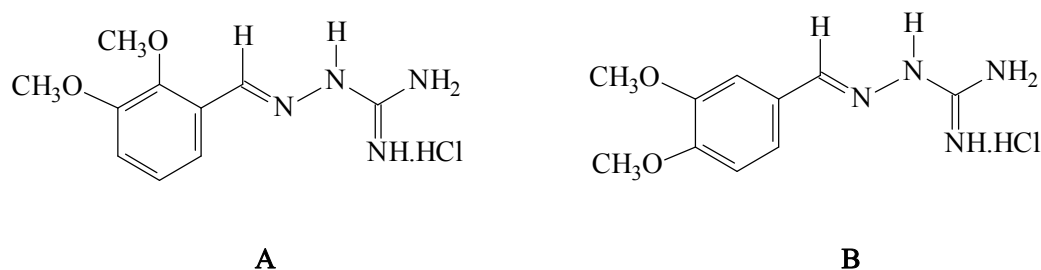


Fig. 1. Structural formula of the 2,3-DMeB (A) and 3,4-DMeB (B).

Taking into account these 2,3-DMeB and 3,4-DMeB previous results, and the lack of data on the potential biological and genotoxic effects of these molecules, this study aims to investigate the 2,3-DMeB and 3,4-DMeB genotoxic potential, employing three experimental models: *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* and the permanent cell line derived from Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cell line). Furthermore, we carry out experiments to determine the antifungal and anti-trypanosome activities of these guanyldiazene derivatives.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Derivatives of guanyldiazene 2,3-DMeB and 3,4-DMeB were synthesized as previously described by Martins *et al.* (2004). The structures of the products were confirmed by infrared (IR), ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR), melting point and comparison with literature. The chemical purity of 2,3-DMeB and 3,4-DMeB was $\geq 98\%$. Amino acids, nitrogen bases, methyl methane sulfonate (MMS), hydrogen peroxide (H_2O_2), 4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO), morpholinepropanesulfonic acid (MOPS),

cyclophosphamide (CP), aflatoxin B₁ and sodium azide were purchased from Sigma (St.Louis, MO, USA). FPG and ENDOIII were obtained from New England BioLabs (USA). Yeast extract, yeast nitrogen base (YNB), bacto-peptone, bacto-agar and Sabouraud dextrose agar were obtained from Difco Laboratories (Detroit, USA). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, L-glutamine, and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Itraconazole was purchased from Janssen Pharmaceutical N. V. (Beerse, Belgium). All other chemicals were of analytical grade, and were obtained from standard commercial suppliers. Aroclor 1254-induced S9 rat liver fraction was purchased from Moltox (Boone, NC, USA). S9 metabolic activation mixture (S9 mix) was prepared according to Maron and Ames (1983).

For all treatments, both derivatives, 2,3-DMeB and 3,4-DMeB were dissolved in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) and distilled water. The appropriate concentrations were obtained by dilution of stock solution immediately prior to use in each assay. The final DMSO concentration in the media never exceeded 0.2%, and the negative control was exposed to an equivalent concentration of solvent (negative control).

2.2. Salmonella/microsome mutagenicity assay

Mutagenicity was assayed by the pre-incubation procedure proposed by (Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000). *S. typhimurium* strains used were: TA97a (detects frameshift mutation in DNA target -C-C-C-C-C-C-; + 1 cytosine), TA98 (detects frameshift mutation in DNA target -C-G-C-G-C-G-C-G-), TA100 (base pair substitution mutation results from the substitution of one leucine [GAG] by one proline [GGG]), TA102 (TAA (ochre: transversions/transitions) which detects oxidative, alkylating mutagens and reactive oxygen species [ROS]), and TA1535 (isogenic to TA100, without

the plasmid pKM101). Bacterial cultures ($1-2 \times 10^9$ cells/mL), were incubated at 37 °C with different amounts of guanylhydrazone derivatives (8-200 µg/plate) in the presence or absence of metabolic activation (S9 mix) for 20 min, without shaking. Then, soft agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, 50 µM histidine, 50 µM biotin, pH 7.4, 42 °C) was added, and the contents of the test tube were immediately poured onto a plate of minimal agar (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium, containing 2% glucose). Aflatoxin B₁ (1 µg/plate) was used as positive control for all strains (in the presence of metabolic activation with S9 mix), and 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO, 0.5 µg/plate) for TA97a, TA98, and TA102 strains, and sodium azide (1 µg/plate) for TA100 and TA1535 strains (absence of S9 mix). Triplicate plates were used for the test substance and the negative (solvent) and positive controls. Plates were incubated in the dark at 37 °C for 48 h before counting revertant colonies.

2.3. Detection of reverse, frameshift and forward mutations in *S. cerevisiae*

The haploid strains XV185-14c (*MAT α ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10*) from R. C. von Brostel (University of Alberta, Canada) and N123 (*MAT α his1-7*) from J. A. P. Henriques (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) were used in the mutagenicity assay. Media, solutions, and buffers were prepared according to Burke *et al.* (2001). Stationary-phase cultures were obtained by inoculation of an isolated colony into liquid YPD media (0.5% yeast extract, 2% bacto-peptone, and 2% glucose) for 48 h. Exponential phase cultures were obtained by inoculating 5×10^6 cells/mL of a stationary-phase YPD culture into fresh YPD medium for 3 h. For treatment, cells were harvested, and washed with phosphate buffered saline solution (PBS; Na₂HPO₄, and NaH₂PO₄; 20mM; pH7.4). A suspension of 1×10^8 cells/ml in exponential or in stationary phase of growth was incubated for 20 h at 30 °C with various concentrations of 2,3-DMeB or 3,4-

DMeB (0.1-1000 μ M) in PBS. 4-NQO (0.5 μ g/mL) was used as positive control in all yeast mutagenic assays. Assays were repeated at least four times, and plating was performed in triplicate for each dose.

The strain XV185-14c was used for reverse and frameshift mutation evaluation. After treatment, cell survival was determined on SC (3-5 days, 30°C), and mutation induction (LYS, HIS or HOM revertants) on the appropriate omission media (7-10 days, 30°C). Whereas *his1-7* is a non-suppressible missense allele, and reversions result from mutation at the locus itself (Snow, 1978), *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele (Hawthorne, 1969), which can be reverted either by locus-specific or by a forward mutation in a suppressor gene (Zimmermann *et al.*, 1984). True reversions and forward (suppressor) mutations at the *lys1-1* locus were differentiated according to (Schuller and Von Borstel, 1974), where the reduced adenine content of the SC-lys medium shows locus reversions as red colonies, and suppressor mutations as white colonies. It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to its response to a series of diagnostic mutagens (Hawthorne and Mortimer, 1963). The N123 strain was used for the evaluation of forward mutation. After the treatment, appropriate dilutions of cells were plated onto SC plates to determine cell survival (3-5 days, 30°C), and onto SC media supplemented with canavanine (7-10 days, 30°C). Forward mutation was measured with the canavanine resistance assay (*CAN1*→*can1*). Wild-type yeast strains express the arginine transporter which also imports canavanine, toxic akin, lead up to cell death. Alterations in the *CAN1* gene that impair Can1p functionality can increase cellular survival in the presence of canavanine (Whelan *et al.*, 1979).

2.4. V79 culture and treatment

Chinese hamster lung fibroblast cells (V79 cells) were cultured under standard conditions in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.2 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were kept in tissue-culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air and were harvested by treatment with 0.15% trypsin-0.08% EDTA in PBS. Cells (5 x 10⁵ cells) were seeded in complete media and grown for one day prior to treatment with the 2,3-DMeB or 3,4-DMeB to evaluation in comet and micronucleus assay. To evaluate clonal survival, 500 cells were grown overnight before treatment with the test guanyldrazone derivatives. Treatment was performed with graded 2,3-DMEB and 3,4-DMEB concentrations (0.1, 1, 10, 100 and 1000 µM) for 3 h in FBS-free medium at 37 °C.

2.5. Cytotoxicity evaluation by colony-forming ability in V79 cells

After treatment, cells were washed and incubated in complete medium at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 7 days. Colonies were fixed with 3% formaldehyde, stained with 1% crystal violet, counted, and their survival expressed as a percentage relative to the negative control treatment (solvent). The concentration was considered cytotoxic when cell survival was 50%.

2.6. Comet assay using V79 cells

After treatment, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in complete medium. Then, cell suspension (3 x 10⁶ cells/mL) were dissolved in 0.75 % low-melting point agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. Slides were then incubated in ice-

cold lysis solution (2.5M NaCl, 10mM Tris, 100mM EDTA, 1% Triton X-100, and 10% DMSO, pH 10.0) at 4°C for at least 1h. To alkaline comet assay version comet slides were then placed in a horizontal electrophoresis box containing freshly-prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH ~13.0) at 4 °C for 20 min in order to facilitate DNA unwinding. A 300 mA and 25 V electric current was applied for 20 min to perform DNA electrophoresis (Singh *et al.*, 1988; Hartman *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2004). In the modified comet assay, slides were removed from the lysis solution and before electrophoresis were treated with DNA repair enzymes, as previously described (Speit, 2004; Dizdaroglu *et al.*, 2005). Briefly, slides were washed three times in enzyme buffer (40 mM Hepes, 100 mM KCl, 0.5 Mm Na₂EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0), and incubated with FPG (30 min 37°C; 100 mU per gel) or EndoIII (45 min 37°C; 100 mU per gel). The neutral comet assay was performed following essentially the same procedure as the alkaline version except for the electrophoresis conditions (Wojewódzka *et al.*, 2002). Electrophoresis was conducted for 60 min, after a 60 min equilibrium period, in neutral electrophoresis buffer (100 mM Tris and 300 mM sodium acetate at pH 8.5) at 12 mA and 14 V (0.5 V/cm). All the above steps were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5) and stained using the silver staining protocol described in Nadin *et al.*, (2002). For the analysis, images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were observed per experimental group. Cells were also visually scored into five classes, according to tail length: (1) class 0: undamaged, without a tail; (2) class 1: with tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with tail 1–2 x longer than the diameter of the head; (4) class 3: with a tail 2x longer than the diameter of the head; (5) class 4: significant damage, with a long tail, measuring more than 3x the diameter of the head. A value (damage index-DI) was assigned to each comet according to its class (Speit *et al.*,

1999). Damage index ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells \times 4). Damage frequency (DF) is the proportion of cells presenting tails after electrophoresis, and this was also considered in our analyses. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments. CP (45 μ M) and MMS (40 μ M) were used as positive control with and without metabolic activation, respectively. H₂O₂ (150 μ M) was used as positive control for measurement of DNA oxidative damage in modified comet assay.

2.7. Clastogenic evaluation using micronucleus assay

The micronucleus assay was performed according to Bonacker *et al.* (2004), with minor modifications. After treatment, cultures were washed twice with the medium, and Cytocalasin B (Cyt-B- 2 μ g/mL) was added. Cultures were harvested 21 h after Cyt-B addition. Cells were detached from the well surface by trypsinization, and the cellular suspension was centrifuged at 2000 rpm/5 min, and then resuspended in 75 mM KCl solution maintained at 4 °C for 3 min (mild hypotonic treatment). Subsequently, the cells were centrifuged and a methanol/acetic acid (3:1) solution was gently added. This fixation step was repeated twice and finally, cells were resuspended in a small volume of methanol/acetic acid and dropped on to clean slides. Slides were stained with 10% Giemsa (pH 6.8) for 3-4 min. Slides were mounted, and coded prior to analysis. MMS (40 μ M) was used as positive control. Micronuclei were counted in 2000 binucleated cells (BNC) with well-preserved cytoplasm. The identification of micronuclei was carried out according to Fenech, (2000).

2.8. Strains used in the antifungal test

Thirty-nine *Candida* strains were used for determining the *in vitro* antifungal activity: *Candida albicans* (American Type Culture Collection - ATCC 10231, ATCC 18804, ATCC 28367, 0050-L, 0051-L, MG), *C. glabrata* (0030-L, 0013-L, 993, ATCC 2001, MG), *C. guilliermondii* (0031-L, 168, 992), *C. krusei* (ATCC 6258, ATCC 20298, 0037-L, 219, 990, MG), *C. parapsilosis* (ATCC 22019, 4063, 0052-L, 0032-L, II, MG), *C. kefyr* Y-329, *C. tropicalis* (0033-L, 0056-L, ATCC 750, 0055-L) and *C. dubliniensis* (22, 23, 25, 27, 28, 29, 0029-L, ATCC 7987). The minimum inhibitory concentration (MIC) of itraconazole and guanilhidrazones was determined by using broth microdilution techniques as described by the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) for yeasts M27-A2. The strains were subcultured onto Sabouraud dextrose agar at 35 °C for 24 hours. The inoculum was suspended in saline solution and adjusted to a final concentration of 0.5-2.5 x 10³ CFU/ml in RPMI 1640 medium buffered to pH 7.0 with MOPS (165 mM). In sterilized flat-bottomed 96-well microtitre plates (Cral Plast), were added 100 µl of each drug to one of the columns 1 to 10; 100 µl of RPMI 1640 medium was added in columns 11 and 12, which were used as growth positive and medium sterile controls, respectively. Aliquots 100 µl of the standardized aforementioned inoculum was added to the wells and the microtitre plates were incubated at 35°C for 24h and after incubation the MIC was determined visually by comparison with the drug-free growth control well. The MIC was defined as the lowest concentration of the antifungal agent preventing 50% of visible fungal growth. Itraconazole was used as positive control, and experiments were done in triplicate.

2.9. *Trypanosoma cruzi* growth and treatment

Epimastigote forms of the CL Brener strain of *Trypanosoma cruzi* were grown at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium (pH 7.3) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), streptomycin sulphate (0.2 g l⁻¹) and penicillin (200 000 units l⁻¹). For testing resistance to guanilhydrazones, parasite cultures containing 1 x 10⁷ cells/ml were treated with designed concentrations (75, 125 and 250 µM). Cells were counted after 48 h. The cell numbers were determined in a cytometry chamber using the erythrosine vital stain to differentiate living and dead cells. Experiments were performed in triplicate.

2.10. Statistical analysis

Mutagenicity data in bacteria were analyzed using Salmonel software. To evaluate mutagenicity induction, Mutagenic Index (MI) was calculated as the number of his⁺ per plate in the studied sample divided by the number of his⁺ revertant per plate in the negative control. A compound was considered positive for mutagenicity only when: (a) the number of revertants was at least double the spontaneous yield (MI ≥ 2) for TA97a, TA98, TA100 and TA102, and at least triple the spontaneous yield (MI ≥ 3) for TA1535; (b) a significant response was determined by analysis of variance ($P \leq 0.05$); and (c) a reproducible positive dose-response ($P \leq 0.01$) was present. An effect was considered cytotoxic when MI ≤ 0.6.

Data from the mutagenicity assays with *S. cerevisiae* and genotoxicity tests with V79 cells are expressed as means ± standard deviation (SD), and were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and means were compared using the Tukey test, with $P < 0.05$ considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Mutagenic effects in Salmonella typhimurium

Using the same method followed in the mutagenicity experiment, in the absence of metabolization, guanylhydrazone derivatives were firstly tested for TA100 strain toxicity at concentrations of 8, 40, 200, 1000, and 5000 µg/plate. The test-substance was considered toxic if the Mutagenic Index (colony counts on the test plate/average counts on the negative control plates; MI) value was lower than 0.50 in at least two of the tested concentrations, and of the background showed evidence of toxicity. The results of the range-finder experiment were used to define the dose range to be applied in the mutagenicity test, which concentration range should be the highest allowed by the toxicity or the solubility of the test substance, or up to a maximum concentration of 5000 µg/plate. The range finding results indicate cytotoxicity in concentrations higher than 200 µg/plate for 2,3-DMeB and 3,4-DMeB (data not shown), and therefore, the concentrations of 40, 80, 120, 160 and 200 µg/plate were used to mutagenic assay. The 2,3-DMeB and 3,4-DMeB guanylhydrazone derivatives do not induce a significant mutagenic effects TA97a, TA98, TA100, TA1535 and TA102 strains, in the absence or presence of metabolic activation (Table 1 and 2).

Table1. Induction of *his+* revertants in *S. typhimurium* by 2,3-DMeB and 3,4-DMeB without metabolic activation (S9 mix).

<i>S. typhimurium</i>		TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
Substance	Dose (µg/plate)	rev/plate ^a	MI ^b	rev/plate ^a	MI ^b	rev/plate ^a	MI ^b	rev/plate ^a	MI ^b	rev/plate ^a	MI ^b
PC ^c		449.3 ± 114.3	4.76	578.7 ± 15.5	15.5	1037.3 ± 6.5	6.48	1810.7 ± 6.3	6.34	250.0 ± 6.9	22.06
NC ^d		94.3 ± 4.9	-	37.3 ± 6.5	-	160.0 ± 13.9	-	285.3 ± 22.0	-	11.3 ± 2.1	-
2,3-DMeB	40	80.3 ± 9.6	0.85	29.7 ± 4.0	0.79	173.3 ± 12.2	1.08	421.3 ± 49.7	1.47	14.0 ± 3.0	1.23
	80	92.0 ± 17.3	0.97	34.0 ± 3.0	0.91	117.3 ± 12.9	0.73	264.0 ± 10.6	0.92	12.3 ± 3.2	1.09
	120	73.0 ± 31.4	0.77	31.0 ± 2.0	0.83	132.7 ± 23.2	0.82	245.3 ± 70.5	0.85	11.7 ± 1.1	1.03
	160	74.0 ± 0.78	0.78	34.7 ± 3.2	0.92	130.7 ± 18.5	0.81	217.3 ± 40.1	0.76	11.0 ± 5.3	0.68
	200	66.0 ± 0.69	0.69	35.7 ± 3.5	0.95	130.0 ± 44.7	0.81	221.3 ± 12.2	0.77	5.5 ± 1.7	0.44
3,4-DMeB	40	96.7 ± 16.0	0.97	26.3 ± 6.3	1.05	130.7 ± 17.0	1.00	300.7 ± 39.1	0.93	9.7 ± 3.1	0.80
	80	96.7 ± 21.9	0.97	31.3 ± 3.5	1.25	118.0 ± 15.9	0.89	272.0 ± 10.6	0.83	5.7 ± 2.5	0.47
	120	99.7 ± 1.0	1.00	30.0 ± 3.0	1.20	109.3 ± 4.2	0.83	274.0 ± 29.5	0.84	8.7 ± 1.5	0.72
	160	107.3 ± 23.0	1.08	15.7 ± 5.1	0.62	113.0 ± 12.7	0.85	282.0 ± 37.4	0.87	11.3 ± 4.0	0.94
	200	116.7 ± 9.0	1.17	24.3 ± 7.0	0.97	122.7 ± 13.6	0.77	293.3 ± 22.0	0.90	8.7 ± 1.1	0.72

^aNumber of revertants/plate: mean of three independent experiments ± SD; ^bMI: mutagenic index (n°. of *his+* induced in the sample/n°. of spontaneous *his+* in the negative control).

^cPC: positive control (TA100 and TA1535) sodium azide (5µg/plate); (TA97a, TA98 and TA1535) 4-NQO (0.5 µg/plate).

^dNC: negative control dimethyl sulfoxide (10 µl) used as a solvent.

Table2. Induction of *his*⁺ revertants in *S. typhimurium* by 2,3-DMeB and 3,4-DMeB with metabolic activation (S9 mix).

<i>S. typhimurium</i>		TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
Substance	Dose (µg/plate)	rev/plate ^a	MI ^b	rev/plate ^a	MI ^b	rev/plate ^a	MI ^b	rev/plate ^a	MI ^b	rev/plate ^a	MI ^b
PC ^c		522.7 ± 64.7	3.29	485.3 ± 11.5	11.55	1157.3 ± 8.8	8.76	709.3 ± 2.9	2.89	108.0 ± 11.1	9.0
NC ^d		158.5 ± 27.6	-	42.0 ± 4.6	-	132.0 ± 26.5	-	263.3 ± 42.9	-	11.6 ± 2.1	-
2,3-DMeB	40	162.7 ± 11.6	1.02	49.7 ± 12.5	1.18	140.0 ± 22.5	1.06	278.7 ± 62.3	1.05	11.6 ± 3.5	0.97
	80	158.3 ± 15.6	0.99	37.5 ± 2.1	0.82	154.0 ± 2.0	1.16	285.3 ± 30.6	1.08	18.0 ± 2.6	1.50
	120	155.3 ± 22.2	0.98	37.0 ± 3.0	0.88	149.3 ± 24.1	1.13	380.0 ± 28.0	1.44	22.3 ± 11.2	1.86
	160	159.3 ± 1.0	1.0	36.0 ± 4.0	0.85	147.3 ± 20.2	1.11	317.3 ± 28.4	1.20	13.3 ± 2.1	1.11
	200	134.0 ± 32.7	0.84	39.7 ± 1.5	0.94	161.3 ± 9.2	1.22	406.7 ± 26.6	1.54	12.7 ± 4.2	1.05
3,4-DMeB	40	105.0 ± 20.2	1.11	31.0 ± 1.7	0.90	125.3 ± 13.3	1.21	348.7 ± 51.0	0.86	9.0 ± 1.7	0.93
	80	108.7 ± 11.7	1.15	26.3 ± 5.5	0.76	124.7 ± 11.0	1.21	302.7 ± 23.1	1.01	12.0 ± 1.0	1.24
	120	151.3 ± 11.5	1.60	27.7 ± 3.2	0.80	137.3 ± 4.2	1.33	354.7 ± 46.4	1.00	12.7 ± 2.1	1.31
	160	109.3 ± 24.3	1.16	24.3 ± 3.2	0.70	112.7 ± 11.5	1.09	352.0 ± 12.0	1.00	10.7 ± 1.1	1.10
	200	76.7 ± 23.9	0.81	30.0 ± 5.6	0.87	120.7 ± 15.3	1.17	348.0 ± 56.0	0.99	6.0 ± 3.5	0.62

^aNumber of revertants/plate: mean of three independent experiments ± SD; ^bMI: mutagenic index (n°. of *his*⁺ induced in the sample/n°. of spontaneous *his*⁺ in the negative control).

^cPC: positive control aflatoxin B1 (0.5 µg/plate)

^dNC: negative control dimethyl sulfoxide (10 µl) used as a solvent.

3.2. Evaluation of cytotoxicity and mutagenesis in yeast

In all treatment conditions used, the guanylhyazones 2,3-DMeB and 3,4-DMeB induced a slight cytotoxic effects, in both XV185-14c and N123 yeast strains (Table 3 and 4). No mutagenic effect was observed in stationary phase of growth in XV185-14c and in N123 strains (Table 3 and 4). When XV185-14c cells were treated in exponential phase of growth, guanylhyazone derivates induced a significant increase in frequency of point mutations in *lys1* locus at 10, 100 and 1000 μ M treatments and in *his1* locus at 100 and 1000 μ M (Table 3, central panel). Significant results were also observed in *hom1* locus (frameshift mutations) at 10, 100 and 1000 μ M treatments for 2,3-DMeB, and 1000 μ M treatment for 3,4-DMeB (Table 3, lower panel). In N123 exponential cells, forward mutation frequency at *can1* locus were significant at every applied concentration for 2,3-DMeB, and only at higher concentration (100 μ M and 1000 μ M) for 3,4 DMe-B (Table 4, lower panel).

Table 3. Induction of point mutation (*his1-7*), ochre allele (*lys1-1*) and frameshift (*hom3-10*) mutations in haploid XV185-14c strain of *S. cerevisiae* after 2,3-DMeB and 3,4-DMeB treatments.

Agent	Treatment	Survival (%)	His1/10 ⁷ survivors ^a	Lys1/10 ⁷ survivors ^b	Hom3/10 ⁷ survivors ^a
<i>Stationary phase – Cells treated in PBS</i>					
Negative control ^c	0	100 ^c	15.97 ± 0.99 ^c	3.99 ± 2.47 ^c	0.43 ± 0.09 ^c
4NQO ^d	0.5 µg/mL	54.33 ± 2.40	49.21 ± 11.28***	11.69 ± 3.65***	4.27 ± 0.07***
2,3-DMeB	0.1 µM	67.33 ± 3.84	7.01 ± 0.99	3.60 ± 0.05	0.46 ± 0.01
	1 µM	66.50 ± 7.50	6.29 ± 0.20	1.61 ± 0.07	0.36 ± 0.02
	10 µM	63.00 ± 2.51	11.82 ± 0.12	3.32 ± 0.02	0.77 ± 0.10
	100 µM	61.33 ± 5.81	11.21 ± 0.09	2.25 ± 0.11	0.49 ± 0.12
	1000 µM	47.00 ± 0.57	15.20 ± 1.21	5.35 ± 0.27	0.83 ± 0.20
3,4-DMeB	0.1 µM	72.00 ± 3.60	7.75 ± 0.20	2.11 ± 0.06	0.75 ± 0.23
	1 µM	69.33 ± 4.70	6.25 ± 0.23	3.38 ± 0.07	0.49 ± 0.10
	10 µM	69.66 ± 6.36	8.27 ± 0.01	2.05 ± 0.03	0.52 ± 0.10
	100 µM	68.50 ± 4.50	7.56 ± 0.09	2.24 ± 0.12	0.81 ± 0.20
	1000 µM	49.33 ± 0.33	17.00 ± 0.21	3.79 ± 0.09	1.07 ± 0.36
<i>Exponential phase - Cells treated in PBS</i>					
Negative control ^c	0	100	14.81 ± 0.25	2.16 ± 0.46	0.92 ± 0.24
4NQO ^d	0.5 µg/mL	50.00 ± 1.73	51.55 ± 3.8***	16.52 ± 0.11***	6.77 ± 0.79***
2,3-DMeB	0.1 µM	69.33 ± 10.26	9.53 ± 0.19	2.13 ± 0.20	1.47 ± 0.12
	1 µM	57.33 ± 6.48	9.51 ± 0.32	2.07 ± 0.50	2.17 ± 0.06
	10 µM	49.00 ± 5.50	14.85 ± 0.62	4.36 ± 0.60*	2.48 ± 0.41*
	100 µM	44.66 ± 8.09	17.15 ± 0.62*	4.69 ± 0.90*	3.59 ± 0.02**
	1000 µM	24.33 ± 7.35	20.53 ± 0.61**	5.77 ± 0.16**	4.35 ± 0.10***
3,4-DMeB	0.1 µM	57.33 ± 6.33	10.52 ± 0.41	3.39 ± 0.90	2.29 ± 0.78
	1 µM	55.33 ± 3.18	10.22 ± 0.21	3.60 ± 0.80	1.62 ± 0.30
	10 µM	55.00 ± 5.00	17.43 ± 0.68	4.74 ± 0.03*	0.76 ± 0.01
	100 µM	47.33 ± 4.48	20.55 ± 1.01**	5.41 ± 0.14**	1.85 ± 0.54
	1000 µM	38.33 ± 5.48	24.12 ± 2.90***	11.35 ± 0.63***	4.12 ± 0.22***

^a Locus-specific revertants.; ^b Locus non-specific revertant (forward mutation).; ^c Negative control (solvent).; ^d Positive control.; ^e Mean and standard deviation per three independent experiments. * Significantly different from the negative control at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.; *** $P < 0.001$ / one-way ANOVA–Tukey’s multiple comparison test.

Table 4. Induction of forward mutation (*canI*) in haploid N123 strain of *S. cerevisiae* after 2,3-DMeB and 3,4-DMeB treatment.

Agent	Treatment	Survival (%) ^c	Can/10 ⁷ survivors ^c
<i>Stationary phase – Cells treated in PBS</i>			
Negative control ^a	0	100	0.86 ± 0.26
4NQO ^b	0.5 µg/mL	51.33 ± 1.20	14.98 ± 2.29***
<i>2,3-DMeB</i>	0.1 µM	76.50 ± 3.50	1.59 ± 0.39
	1 µM	78.00 ± 0.10	1.20 ± 0.29
	10 µM	75.33 ± 6.98	1.39 ± 0.31
	100 µM	74.50 ± 0.50	1.03 ± 0.30
	1000 µM	63.00 ± 2.00	0.27 ± 0.03
<i>3,4-DMeB</i>	0.1 µM	78.33 ± 4.66	1.06 ± 0.24
	1 µM	80.66 ± 4.66	1.17 ± 0.23
	10 µM	74.33 ± 2.33	1.10 ± 0.36
	100 µM	74.00 ± 1.00	0.93 ± 0.22
	1000 µM	62.33 ± 2.33	0.91 ± 0.15
<i>Exponential phase - Cells treated in PBS</i>			
Negative control ^a	0	100	3.72 ± 0.19
4NQO ^b	0.5 µg/mL	46.00 ± 1.73	30.90 ± 3.11***
<i>2,3-DMeB</i>	0.1 µM	67.00 ± 8.62	6.22 ± 0.55*
	1 µM	84.00 ± 5.00	6.52 ± 1.31*
	10 µM	70.50 ± 10.50	5.93 ± 0.33*
	100 µM	61.50 ± 0.50	6.51 ± 0.56*
	1000 µM	55.66 ± 1.45	7.85 ± 0.37**
<i>3,4-DMeB</i>	0.1 µM	69.66 ± 4.48	4.64 ± 1.04
	1 µM	74.00 ± 7.00	5.06 ± 0.88
	10 µM	70.50 ± 0.50	5.50 ± 0.67
	100 µM	66.00 ± 2.00	6.31 ± 0.45*
	1000 µM	62.33 ± 2.40	7.26 ± 0.52**

^a Negative control.; ^b Positive control.; ^c Mean and standard deviation per three independent experiments. Data significant in relation to negative control at *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001/one-way ANOVA–Tukey’s multiple comparison test.

3.3. 2,3-DMeB and 3,4-DMeB cytotoxicity effects in V79 cells

In order to obtain information on 2,3-DMeB and 3,4-DMeB cytotoxicity in V79 cells the effects on cell growth based on colony forming ability were evaluated. Results in Fig. 2 show that guanylylhydrazone derivatives studied have similar dose-dependent cytotoxic effect on V79 cells. At high concentrations these guanylylhydrazone derivatives exerts a

important cytotoxic effects, decreasing the relative survival to 18.3% for 2,3-DMeB and 13.7% for 3,4-DMeB at 1000 μM .

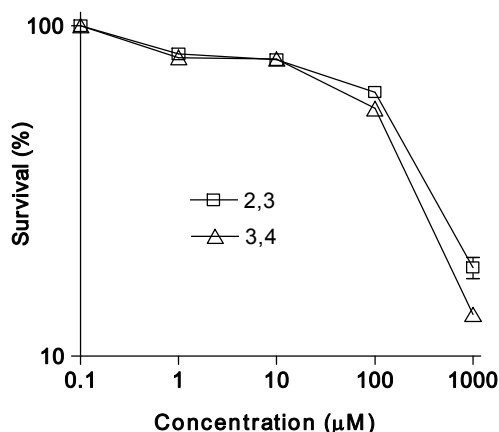


Fig. 2. Clonogenic survival of V79 cells after treatment with 2,3-DMeB and 3,4-DMeB at different concentrations for 3 h in medium without FBS.

3.4. 2,3-DMeB and 3,4-DMeB effects on DNA integrity in V79 cells

The induction of single-strand and double-strand breaks in the V79 cell line was analyzed using both the alkaline and neutral versions of the comet assay. In alkaline comet assay without metabolic activation, guanylhydrazones clearly resulted in a significant increase in DI and DF means as compared to the control cells, however, the 2,3-DMeB induces significant DNA breaks in all used concentrations, while to 3,4-DMeB this increase occurs at higher concentrations (100 and 1000 μM) (Table 5, upper panel). Interestingly, the metabolic activation results in a decrease in guanylhydrazone derivatives induced DNA damage, reducing the genotoxic effects in V79 cells (Table 5, lower panel). In the neutral comet assay, 2,3-DMeB and 3,4-DMeB only induce significant increase in the damage index at higher concentration (1000 μM), showed that in this concentration these drugs can induce DNA double strand breaks (DSB) (Table 6).

Table 5. Effects of 2,3-DMeB and 3,4-DMeB in V79 cells exposed for 3 h and evaluated by comet assay in alkaline conditions (pH~13.0) in presence and absence of metabolic activation.

Treatment		Damage Index ^a	Damage Frequency (%) ^a
<i>Without metabolic activation S9</i>			
<i>Negative Control^b</i>		32.85 ± 3.00	24.66 ± 2.51
<i>MMS^c</i>	40 µM	192.66 ± 5.03***	88.00 ± 3.60***
<i>2,3-DMeB</i>	0.1µM	55.25 ± 3.50*	45.75 ± 2.06*
	1µM	61.50 ± 6.45*	49.25 ± 1.50**
	10µM	62.75 ± 4.57*	49.25 ± 6.07**
	100µM	90.50 ± 4.65**	60.00 ± 6.37***
	1.000µM	130.33 ± 10.21***	69.66 ± 2.08***
<i>3,4-DMeB</i>	0.1µM	19.00 ± 2.82	19.00 ± 2.82
	1µM	41.25 ± 6.13	39.75 ± 5.12
	10µM	39.33 ± 5.03	34.33 ± 2.51
	100µM	71.33 ± 7.50**	62.00 ± 4.35***
	1.000µM	191.00 ± 5.65***	82.50 ± 2.12***
<i>With metabolic activation S9</i>			
<i>Negative Control^b</i>		32.50 ± 4.04	24.80 ± 0.57
<i>CP^c</i>	45 µM	82.50 ± 14.43**	57.00 ± 5.77**
<i>2,3-DMeB</i>	0.1µM	29.25 ± 4.50	26.00 ± 4.96
	1µM	37.75 ± 8.13	35.00 ± 5.94
	10µM	40.25 ± 3.30	36.50 ± 3.31
	100µM	52.25 ± 4.85*	40.75 ± 0.95
	1.000µM	116.00 ± 5.35**	68.75±2.50**
<i>3,4-DMeB</i>	0.1µM	18.25 ± 7.13	34.75 ± 5.31
	1µM	30.75 ± 3.09	26.50 ± 4.04
	10µM	54.00 ± 4.69	41.00 ± 3.91
	100µM	68.25 ± 3.77*	44.75 ± 3.20
	1.000µM	127.75 ± 8.57**	70.00 ± 2.16**

^a Mean values and standard deviation obtained from average of 100 cells per experiment total of four experiments for each substance. ^b Negative control (solvent). ^c Positive control (MMS, without metabolic activation or ciclophosphamide, with metabolic activation). Data significant in relation to negative control at *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001/one-way ANOVA–Tukey’s multiple comparison test.

Table 6. Effects of 2,3-DMeB and 3,4-DMeB in V79 cells exposed for 3 h and evaluated by comet assay in neutral conditions (pH ~ 8.0) in absence of metabolic activation.

Treatment		Damage Index	Damage Frequency (%)
<i>Negative Control</i>		23.50 ± 2.12	23.50 ± 2.12
<i>MMS</i>	40 µM	141.50 ± 5.53***	85.00 ± 2.82***
<i>2,3-DMeB</i>	0.1µM	22.50 ± 3.53	22.50 ± 3.53
	1µM	24.00 ± 2.82	24.00 ± 2.82
	10µM	24.00 ± 5.65	24.00 ± 5.65
	100µM	35.50 ± 3.53	24.50 ± 2.12
	1.000µM	64.00 ± 5.65***	64.00 ± 5.65***
<i>3,4-DMeB</i>	0.1µM	28.00 ± 1.41	24.00 ± 2.82
	1µM	29.00 ± 1.41	23.50 ± 0.70
	10µM	26.50 ± 0.70	25.00 ± 1.41
	100µM	36.50 ± 2.12	31.00 ± 2.82
	1.000µM	78.50 ± 6.36***	71.50 ± 0.70***

^aMean values and standard deviation obtained from average of 100 cells per experiment total of four experiments for each substance. ^bNegative control (solvent). ^cPositive control (MMS). Data significant in relation to positive control group at *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001/one-way ANOVA–Tukey’s multiple comparison test.

3.5. Oxidative DNA damage in V79 cells

In order to check a possible oxidant effect of 2,3-DMeB and 3,4-DMeB, we used the modified comet assay version, with lesion-specific endonucleases (FPG and ENDOIII), which recognize certain damaged bases and create breaks. The FPG, is specific for oxidized purines, including 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, and other ring-opened purines (Speit *et al.* 2004). The EndoIII recognizes oxidized pyrimidines, including thymine and uracil glycol (Smith *et al.* 2006). The levels of EndoIII and FPG sensitive sites were calculated as the score obtained with enzymes minus the score without enzymes (only with enzyme buffer), after treatment with guanylhydrazones or positive control (H₂O₂). As can be see in Fig. 3 both guanylhydrazone derivates induce significant oxidative damage at all concentrations used in V79 cells. The guanylhydrazones oxidative

scores were similar to both enzyme treatments, suggesting that these drugs can oxidize both, purines and pyrimidines (Fig. 3). Moreover, our results showed that guanylhydrazones treatments plus lesion-specific endonucleases induce a substantial increase in DI, when compared to the results in the traditional alkaline comet version, thus suggesting that the major kind of lesion can be the oxidative damage. It can be seen in Fig. 3 as well that the post-incubation with enzymes after H₂O₂ treatment show significant increase in DNA migration validating the assay.

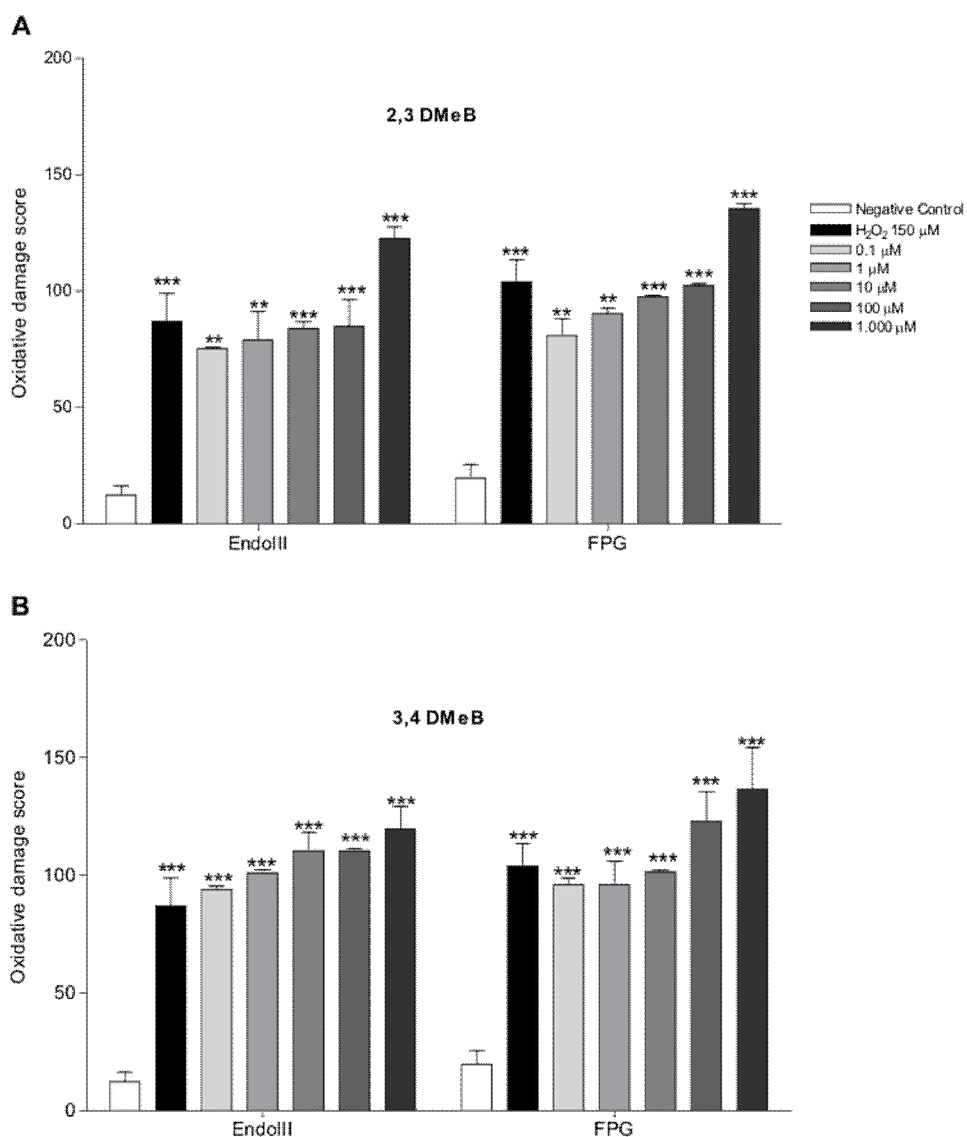


Fig. 3. DNA damage measured by comet assay in V79 cells exposed 2,3-DMeB (A) and 3,4-DMeB (B) at 37°C for 3 hour with subsequent treatment with buffer, EndoIII or FPG. The levels of EndoIII and FPG sensitive sites were calculated as the score obtained with enzymes minus the score without enzymes (buffered) after treatment with 2,3-DMeB and 3,4-DMeB or H₂O₂. Means and standard deviation values were determined from an average of 100 cells per replicate, with three replicates per concentration. Data significant in relation to positive control group at **P<0.01 and ***P<0.001/one-way ANOVA–Tukey’s multiple comparison test.

3.6. Micronucleus assay in V79 cells

The *in vitro* cytokinesis-block micronucleus test is a very accurate and efficient tool for detecting chromosomal aberrations as micronuclei in divided versus non-divided cells.

Table 7 shows that 2,3-DMeB and 3,4-DMeB induce a similar significant increase in micronucleated cells frequencies at higher concentrations (100 and 1000 μ M) when compared to the negative control (solvent).

Table 7. Effect of 2,3-DMeB and 3,4-DMeB on proliferation and frequency of micronucleated V79 cells after 3 hours of incubation.

Treatment		Binucleated Cells(%) ^a	Micronucleated cell (2000 binucleated cells) ^a
<i>Negative Control</i> ^b		86.27 \pm 6.51	21.00 \pm 2.00
<i>MMS</i> ^c	40 μ M	46.87 \pm 4.50	79.00 \pm 1.15**
<i>2,3-DMeB</i>	0.1 μ M	61.10 \pm 9.54	17.00 \pm 1.53
	1 μ M	42.43 \pm 6.03	24.00 \pm 1.09
	10 μ M	40.53 \pm 9.45	23.00 \pm 1.15
	100 μ M	37.57 \pm 6.81	33.00 \pm 3.00**
	1.000 μ M	31.70 \pm 4.58	39.00 \pm 1.50**
<i>3,4-DMeB</i>	0.1 μ M	68.83 \pm 10.02	20.00 \pm 2.80
	1 μ M	58.37 \pm 11.59	25.00 \pm 2.31
	10 μ M	50.63 \pm 7.37	27.00 \pm 1.15
	100 μ M	42.30 \pm 11.14	37.00 \pm 1.53**
	1.000 μ M	36.47 \pm 8.74	45.00 \pm 2.16**

^aData represent the mean \pm SD of three independent experiments; ^b Negative control (solvent); ^c positive control. Data significant in relation to positive control group at *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001/one-way ANOVA–Tukey’s multiple comparison test.

3.7. Antifungal activity

In vitro tests for sensitivity of *Candida* regarding the guanilhydrazone and only *Candida* strains that guanylhydrazones had an activity at concentrations with a MIC₅₀ less than 1000 μ M. The 2,3-DMeB revealed a MIC₅₀ equal to 120 μ M for *C. dubliniensis* (strains 22, 25 and 7987) and *C. tropicalis* 0033-L, a MIC₅₀ = 240 μ M for *C. dubliniensis* 28, *C. glabrata* (strains 2001 and MG), *C. guilliermondii* 168, *C. kefyr* Y-329 and *C. tropicalis* 750, and a MIC₅₀ = 480 μ M for *C. albicans* (strains I 0050-L and MG), *C. dubliniensis* (strains 27 and 29), *C. parapsilosis* (strains 4063 and I 0052-L) and *C.*

tropicalis II 0056-L, and a MIC₅₀ = 960 μM for *C. albicans* (strains 10231 and 18804), *C. dubliniensis* (strains 23 and UFRGS 0029-L), *C. krusei* (strains 0037-L, 219 and 990), and *C. parapsilosis* 0032-L. Already, the cytotoxic effect of 3,4-DMeB in all *Candida* strains was observed only at concentrations up to 960 μM. as can see the 2,3-DMeB display a more marked antifungal effect than 3,4-DMeB, although the MIC₅₀ values of 2,3-DMeB are high when compared to classic antifungal itraconazole, that showed antifungal activity in concentrations less than 1.5 μM.

3.8. Anti-trypanosomal activity

Figure 4 shows the results of guanylylhydrazone tested against cultured *T. cruzi* cells. While, 2,3-DMeB derivate induces a more pronounced cytotoxic effect, the 3,4-DMeB derivate showed a subtle cytotoxic effect. The anti-trypanosomal benzonidazole was used as positive control, and as can see it has a cytotoxic effect at least three time greater than 2,3-DMeB.

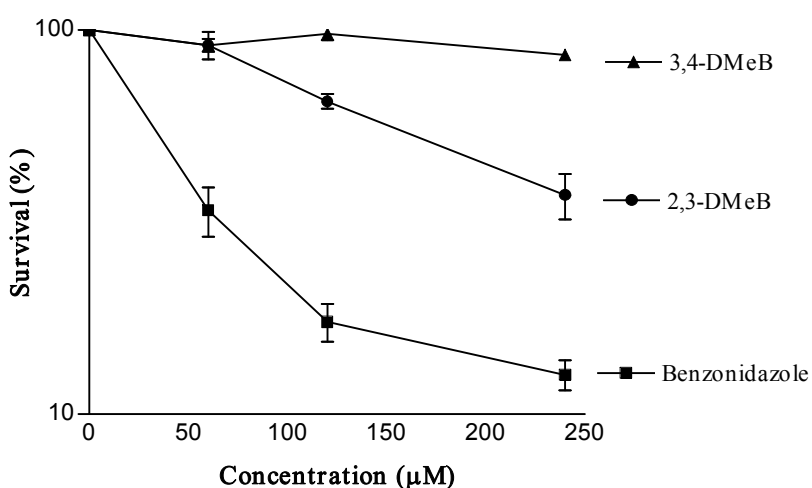


Fig.4. *T. cruzi* survival following treatment with guanylylhydrazones. Cells were counted in a cytometric chamber 24 h after treatment. The experiment was performed in triplicate.

4. Discussion

Guanylhidrazones displayed a variety of biological activities as reported by many studies (Andreani *et al.*, 2008; Papanastasiou *et al.*, 2008; Wenyan *et al.*, 2009). In this work we evaluated the cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity of the two guanylhidrazones derivatives 2,3-DMeB and 3,4-DMeB, with described antibacterial effects (Martins, 2004), in different biological models.

In this study, we demonstrated that 2,3-DMeB and 3,4-DMeB guanylhidrazones derivatives have a weak cytotoxic effects in bacteria and yeast (Table 1 to 4). In the absence of mutagenic effects in *S. typhimurium* (Table 1 and 2), in *S. cerevisiae* guanylhidrazones were able to induced mutagenic effects, depending on the yeast growth phase. While in stationary phase these drugs were non-mutagenic to XV185-14c and N123 strains, in exponential phase an increase in mutagenic frequency can be observed (Table 3 and 4). There are many metabolic and physiological peculiarities in bacteria that could affect the selectivity of different agents towards eukaryotic cells (Brennan and Schiestl, 1998).

In order to further evaluate the guanylhidrazones effects, we used V79 mammalian cells. Our results shown in Fig. 2 indicate that these molecules exhibit similar cytotoxic effects in V79 cells in dose-dependent manner. Moreover, the data of cell proliferation using the percentage of binucleated cells (BNC) in micronucleus assay also show these properties (Table 7). Using the alkaline comet assay in V79 cells, which detect breaks in alkali-labile sites and DNA single- and double-strand breaks, we showed that 2,3-DMeB is able to induces DNA breaks in all used concentrations, while 3,4-DMeB induces an increase in DI only at higher concentrations (Table 5). In the neutral comet assay, 2,3-DMeB and 3,4-DMeB only induce significant increase in the DI at 1000 μ M, suggesting

that is possible that in this concentration both compounds can induce DNA DSB (Table 6). This result is in concordance with micronucleus result (Table 7), since at high concentrations a significant increase of micronucleated cells was observed.

As mentioned, the cytotoxic effect of several guanyldrazones has been associated with loss of mitochondrial function, and this membrane depolarization can induce production of reactive oxygen species (Toninello *et al.*, 1999; Eklund *et al.*, 2001a; Eklund *et al.*, 2001b; Andreani *et al.*, 2005; Andreani *et al.*, 2006). In this manner, we investigated the occurrence of base oxidation in DNA after guanyldrazones treatment in V79 cells using the modified comet assay employing ENDOIII and FPG proteins. The DNA damage in V79 observed after these guanyldrazones exposure could be a result of free radical attack to DNA as a consequence of its ability to impose oxidative stress, since ROS may cause base damage, SSBs, DSBs, and mutation (Halliwell and Gutteridge, 2007). In fact, the results of modified comet assay employing Endo III and Fpg enzymes confirm the oxidative nature of the DNA damage in treated cells (Fig. 3). Moreover, the increase in mutagenesis in yeast also can be explained by generation of free radicals, which will result in bases mispaired in DNA and consequent point mutations, as observed in *his1-7* and *lis1-1* loci (Table 3).

Other guanyldrazones have been described as able to interact with DNA. In this sense, Santos-Filho *et al.* (1997), using a mimetic B-DNA dodecamer d(CGCGAATTCGCG), showed that preferential site for interaction with the guanyldrazones is the AT rich region in the minor groove, and it seems that this interaction occurs through hydrogen bonding between the guanidine moiety of the drugs and the thymine O2 and/or the adenine N3 of the B-DNA. Furthermore, some works showed that guanyldrazones can inhibit DNA topoisomerases (Walzer *et al.*, 1994;

Ekelund *et al.*, 2001). In these sense, we can not exclude a putative role of the interaction between these guanyldrazones and the DNA, which can explain, at least in part, the increase in DNA strand breaks in V79 cells (Table 5) and the frameshift mutations in yeast (Table 3). In this context, the DSBs observed after the guanyldrazones exposure can indicate the ability of these compound to interact with the DNA and/or affect the topoisomerase activity.

It is interesting to note that discrete differences were observed to two guanyldrazones in yeast and V79 cells results, nevertheless the 2,3-DMeB have a more significant effects, suggesting that the position of metoxil group substituent can play a role in genotoxic effects of these derivates. The 3,4-DMeB have a rotational degrees of freedom in guanidine chain in relation to aromatic ring bigger than 2,3-DMeB, since the electrons attachment can causes pair repulsion between the oxygen in methoxyl group in position 2 of aromatic ring and the nitrogen in guanidine moiety (Fig. 1). The rotation of the guanidine side chain in 3,4-DMeB is less inhibited than in 2,3-DMeB, since the lone pairs might cause repulsion between the oxygen of the methoxyl group in position 2 of aromatic ring and the nitrogen in the guanidine moiety (Fig. 1). This repulsion makes the 2,3-DMeB is a more planar structure with decreased rotational degree, which perhaps provide a better DNA interaction or topoisomerase inhibition.

We have also evaluated the antifungal and anti-trypanosome activities of these guanyldrazone derivates, and the results point to the more pronounced activities of 2,3-DMeB. Guanyldrazones with antifungal and anti-trypanosome have been demonstrated by different authors (Kelly *et al.*, 2001; Papanastasiou *et al.*, 2008). Santos-Filho *et al.* (1997) suggested that the guanyldrazone derivates mechanism of action may be occur in three different ways: (a) interaction with the organisms' membranes, which are negatively

charged; (b) interaction with some specific enzyme of the organism, and (c) interaction with its DNA. The different action of 2,3-DMeB and 3,4-DMeB in these biological models may be due to these possibilities of interaction (membranes, specific enzymes and/or DNA). In relation of this, we showed in this work that 2,3-DMeB induces an increase in DNA damage when compared to 3,4-DMeB. Moreover, this cytotoxic effect can be related to ROS production, i.e. benzonidazole, used as positive control in anti-tripanosomal assay in this work, is involved in the production of ROS and, at least in part, act by inducing oxidative stress within the parasite (Pedrosa *et al.*, 2001).

In summary, in this work we showed that the guanylhydrazone derivatives 2,3-DMeB and 3,4-DMeB possess cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects in mammalian cells and that can be related to its oxidative potential, or yet due a possible DNA interaction action. In addition, these effects can be responsible to antifungal and anti-trypanosome activities together with easy permeation through the parasite cell membrane, induced by selective binding of the drugs to the negatively charged exterior of the fungal and parasite. However, the mechanism of action of these guanylhydrazone derivatives cannot yet be fully understood and more data are needed to confirm these hypothesis.

Acknowledgments

This research was supported by the Brazilian Agencies CNPq, CAPES, FAPERGS, GENOTOX-Royal Institute – Genotoxicity Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

References

Andreani, A., Granaiola, M., *et al.*, (2005) Potential antitumor agents. 37. Synthesis and antitumor activity of guanylhydrazones from imidazo[2,1-b]thiazoles and from the new

heterocyclic system thiazolo[2',3':2,3]imidazo[4,5-c]quinoline. *J Med Chem* 48: 3085-3089.

Andreani, A., Granaiola, M., *et al.*, (2008) New Antitumor Imidazo[2,1-*b*]thiazole Guanylhydrazones and Analogues. *J. Med. Chem.* 51:809–816.

Bianchi, M., Ulrich, P., *et al.*, (1995) An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality. *Mol. Med. Mar*;1(3):254-66.

Bianchi, M., Bloom, O., *et al.*, (1996) Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanylhydrazone. *J. Exp. Med.* Mar 1;183(3):927-36.

Bonacker, D., Stoiber, T., Wang, M., Bohm, K.J., Prots, I., Unger, E., Their, R., Bolt, M., Degen, G.H., (2004) Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. *Arch. Toxicol.* 78:575–583.

Brassart, B., Gomez, D., Cian, A., Paterski, R., Montagnac, A., *et al.*, (2007) A New Steroid Derivative Stabilizes G-Quadruplexes and Induces Telomere Uncapping in Human Tumor Cells. *Molecular Pharmacology*72(3):631-640.

Brennan R.J., Schiestl R.H. (1998) Free radicals generated in yeast by the Salmonella test-negative carcinogens benzene, urethane, thiourea and auramine O. *Mutat. Res.* 403(1-2):65-73.

Cerri A, Serra F, Ferrari P, Folpini E, Padoani G, Melloni P (1997) Synthesis, cardiotoxic activity, and structure-activity relationships of 17 beta-guanylhydrazone derivatives of 5 beta-androstane-3 beta, 14 beta-diol acting on the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase receptor. *J Med Chem* 40:3484-3488.

Collins A.R., Duthie S.J., Dobson V.L., (1993). Direct enzymatic detection of endogenous base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14:1733–1735.

Collins, A.R., (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26:249–261.

Desideri N, Sestili I, Piccardoni P, Rotondo S, Cerletti C, Stein ML (1992) Synthesis of some guanylhydrazones and imidazolinyldhydrazones as thromboxane-synthase and platelet aggregation inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)* 325:773-777.

Dizdaroglu, M. (2005) Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat. Res.*, 591: 45–59.

Ekelund S, Nygren P, Larsson R (2001) Guanidino-containing drugs in cancer chemotherapy: biochemical and clinical pharmacology. *Biochem Pharmacol* 61:1183-1193.

Gelbart A, Thomas R (1978) Cardenolide analogues. 7. Synthesis and biological activity of some new steroidal guanylhydrazones. *J Med Chem* 21:284-288.

Gossnitzer E, Feierl G, Wagner U (2002) 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. *Eur J Pharm Sci* 15:49-61.

Halliwell B and Gutteridge JMC (2007) Free Radicals in Biology and Medicine. 4rd ed. Oxford University Press, New York.

Hartman, A., Speit, G., (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay), *Toxicol. Lett.* 90:183-188.

Hawthorne, D.C., (1969) Identification of nonsense codons in yeast, *J. Mol. Biol.* 43: 71–75.

Hawthorne, D.C., Mortimer, R.K., (1963) Suppressors in yeast, *Genetics* 48:617–620.

Janne J, Alhonen L, Leinonen P (1991) Polyamines: from molecular biology to clinical applications. *Ann Med* 23:241-259.

Jobson AG, Cardellina JH 2nd, Scudiero D, Kondapaka S, Zhang H, Kim H, Shoemaker R, Pommier Y. (2008) Identification of a Bis-guanylhydrazone [4,4'-Diacetyldiphenylurea-bis(guanylhydrazone); NSC 109555] as a novel chemotype for inhibition of Chk2 kinase. *Mol Pharmacol.* Oct;72(4):876-84.

Kelly, J.M, Quack, G., Miles, M.M. (2001) In Vitro and In Vivo Activities of Aminoadamantane and Aminoalkylcyclohexane Derivatives against *Trypanosoma brucei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:1360–1366.

Loesberg C, Van Rooji H, Romijn JC, Smets LA (1991) Mitochondrial effects of the guanidino group-containing cytostatic drugs, m-iodobenzylguanidine and methylglyoxal bis (guanylhydrazone). *Biochem Pharmacol* 42:793-798.

Martins TLC (2004) Síntese de guanilhidrazonas, atividade antibiótica e estudos de interação com DNA por RMN. Tese de doutorado, Instituto Militar de Engenharia – Rio de Janeiro.

Martins TLC, Ramalho TC, Franca TCC, Figueroa Villar J (2004) Synthesis of Guanylhydrazones under Microwave Irradiation. *Synthetic Communications* 34:3891-3899.

Messeder, J.C.; Figueroa-Villar, J.D.; Tinoco, L.W.; Souza, E.M.; Santa Rita, R.; de Castro, S.L.(1995) Aromatic guanyl hydrazones: Synthesis, structural studies and in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 5(24):3079-3084.

Miller AL, Johnson BH, Medh RD, Townsend CM, Thompson EB. (2002) Glucocorticoids and polyamine inhibitors synergize to kill human leukemic CEM cells. *Neoplasia*. Jan-Feb;4(1):68-81.

Mitchell B. A., Brown M. H., Skurray R. A. (1997) QacA Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus*. Comparative Analysis of Resistance to Diamidines, Biguanidines, and Guanylhydrazones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Feb: 42 (2) :475–477.

Molina PE, Qian L, Schuhlein D, Naukam R, Wang H, Tracey KJ, Abumrad NN. (1998) CNI-1493 attenuates hemodynamic and pro-inflammatory responses to LPS. *Shock* Nov;10(5):329-34.

Mortelmans K., Zeiger E., (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.* 455:29–60.

Moura D. J., Richter M. F., Boeira J M., Henriques J.A.P., Saffi J. (2007) Antioxidant properties of b-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis* 22(4): 293–302.

Nadin, S. B., Vargas-Roig, L. M. and Ciocca, D. R. (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.* 49:1183–1186.

Papanastasiou I., Tsoinias A., Kolocouris N., Prathalingam S. R., and Kelly J. M. (2008) Design, Synthesis, and Trypanocidal Activity of New Aminoadamantane Derivatives. *J. Med. Chem.* 51:1496–1500.

Pedrosa RC, De Bem AF, Locatelli C, Pedrosa RC, Geremias R, Wilhelm Filho D. (2001) Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Rep.* 6(4):265-70

Richter P.H., Wunderlich I., Keckeis S.H,A (1993) [Amidinohydrazones as subjects of drug research. 2.]. *Pharmazie* 48:163-184.

Santos-Filho, O. A., Figueroa-Villar, J.D.; Araújo, M.T. (1997) Molecular modeling of the interaction of trypanocide guanyl hydrazones with B-DNA, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 7(13):1797-1802.

Schuller R.C., Von Borstel, (1974) Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration. *Mutat. Res.* 24:17–23.

Silva, J., Freitas,T.R., Heuser,V., Marinho,J.R., Erdtmann,B. (2000) Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:270-278.

Smith C.C., O'Donovan M.R., Martin E.A. (2006) hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than Fpg and ENDOIII. *Mutagenesis* 21: 185–190.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Scheider E.L. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp. Cell Res.* 175:184-191.

Snow S. (1978) Absence of suppressible alleles at the *his1* locus of yeast. *Mol. Gen. Genet.* 64:341–342.

Speit G., Hartmann A., (1999) The comet assay (single cell gel test) - a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson DS, editor. *Methods in molecular biology*. 113:203-12.

Speit G., Schutz P., I. Bonzheim, K. Trenz, H. Hoffmann, (2004) Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the Comet assay, *Toxicol. Lett.* 146:151–158.

Sundberg R.J., Dahlhausen D.J., Manikumar, G.; Mavunkel, B.; Biswas, A.; Srinivasan, V.; Mussalam, H.A.; Reid W.A.; Ager, A.L. (1990) Cationic Antiprotozoal Drugs – Trypanocidal Activity of 2-(4'-Formylphenyl) Imidazol [1,2-a] Pyridinium Guanylhydrazones and Related Derivatives of Quaternary Heteroaromatic- Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 33, p. 298.

Troncone L, Rufini V (1997) 131I-MIBG therapy of neural crest tumours (review). *Anticancer Res* 17:1823-1831.

Walzer PD, Foy J, Runck J, Steele P, White M, Klein RS, Otter BA, Sundberg RJ (1994) Guanylhydrazones in therapy of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunosuppressed rats. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2572-2576.

Wenyan Wu, Diptesh Sil, Szostak M. L., Malladi S.S., Warshakoon H.J., Kimbrell M. R., Cromer J. R., David S.A. (2009) Structure–activity relationships of lipopolysaccharide sequestration in guanylhydrazone -bearing lipopolyamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:709–715

Whelan, W. L., Gocke, E. and Manney, T. R. (1979) The CAN1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*: fine-structure analysis and forward mutation rates. *Genetics*, 91: 35–51.

Wojewodzka M., Buraczewska I., Kruszewski M. (2002) A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody, *Mutat. Res.* 518:9–20.

Williams-Ashman, H.G. and Seidenfeld, J.(1986) Aspects of the biochemical pharmacology of methyl glyoxal bis(guanylhydrazone). *Biochemical Pharmacology* 35(8):1217-1225.

Zimmermann F.K., Von Borstel R.C., Von Halle E.S., Parry J.M., Siebert D., Zetterberg G., Barale R., Loprieno N. (1984) Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.* 133:199-244.

IV DISCUSSÃO

Ao longo dos anos tem-se verificado um enorme avanço científico envolvendo pesquisas farmacológicas as quais visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Os excelentes resultados dos experimentos nesta área tem sido determinantes para o aumento da qualidade de fármacos disponíveis na indústria farmacêutica (Barreiro & fraga, 2005; Viegas Jr. *et al.*, 2006; Barreiro, 2007). Entre os compostos farmacologicamente ativos e com efeitos terapêuticos promissores podem-se incluir as guanilhidrazonas que são amplamente descritas na literatura demonstrando diversas atividades biológicas (Papanastasiou *et al.*, 2008; Andreani *et al.*, 2008; Ming-Hon Hou *et al.*, 2009; Wenyan *et al.*, 2009).

As guanilhidrazonas apresentam custos acessíveis e suas sínteses são relativamente fáceis, podendo então se tornar apropriadas 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 destes compostos. Deste modo, no presente estudo, buscou-se investigar a citotoxicidade, a genotoxicidade, o poder oxidativo e as atividades biológicas dos dois derivados de guanilhidrazonas (2,3-DMeB e 3,4-DMeB).

1. Citotoxicidade dos derivados de guanilhidrazonas

No capítulo I foram apresentados experimentos realizados para elucidação da citotoxicidade dos derivados de guanilhidrazonas: Teste *Salmonella*/microsoma, ensaios em *Saccharomyces cerevisiae*, e ensaios em V79.

Para o teste de citotoxicidade em *Salmonella*/microsoma foi utilizada a linhagem TA100 de *S. typhimurium* que foi exposta a concentrações crescentes dos dois derivados de guanilhidrazonas (2,3-DMeB e 3,4-DMeB), ambos os derivados apresentaram um efeito citotóxico em concentrações acima de 200 µg na ausência do sistema de metabolização S9-mix (Capítulo I, Item 3.1).

A citotoxicidade na levedura *S. cerevisiae*, foi analisada nas linhagens haplóides N123 e XV185-14c, pelo teste viabilidade celular, onde ambas as linhagens foram expostas aos dois derivados de guanilhidrazonas em concentrações crescentes. Os dados

demonstram uma importante redução na viabilidade celular nas concentrações mais altas dos dois derivados e que o derivado 2,3-DMeB exibe um maior efeito citotóxico em relação o derivado 3,4-DMeB (Capítulo I, Tabela 3 e 4).

Quando analisada a citotoxicidade em células de mamíferos V79, empregando o ensaio de sobrevivência clonogênica, os resultados demonstraram estar de acordo com os apresentados em bactéria e em levedura, onde foi possível também observar que os derivados 2,3-DMeB e 3,4-DMeB mostram um efeito citotóxico somente em altas concentrações (Capítulo I, Figura 2).

Percebe-se que os dois compostos apresentaram efeito citotóxico nos três organismos de forma similar, onde se verificou que estes derivados são citotóxicos quando utilizados em altas concentrações. Os efeitos citotóxicos de vários derivados de guanilhidrazonas têm sido associados inibição da respiração mitocondrial afetando o complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons, resultando na redução da produção de ATP, e conseqüentemente a perda do potencial de membrana mitocondrial, podendo levar a morte celular ou ter como conseqüência a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Toninello *et al.*, 1999; Eklund *et al.*, 2001a; Eklund *et al.*, 2001b; Andreani *et al.* 2005; Andreani *et al.*, 2006).

2. A genotoxicidade dos derivados de guanilhidrazonas

Para avaliação da genotoxicidade foram utilizados experimentos com bactérias (teste *Salmonella*/microssoma), leveduras (ensaios nas linhagens N123 e XV185-14c) e células de mamíferos em cultura (ensaio cometa em condições de pH alcalino e neutro, e o teste de micronúcleos).

Nos ensaios com a bactéria *S. typhimurium* os compostos 2,3-DMeB e 3,4-DMeB não foram capazes de induzir mutações nas diferentes linhagens. Ao contrário do ocorrido no teste *Salmonella*/microssoma, na levedura *S. cerevisiae* durante a fase exponencial em ausência de crescimento quando exposta aos dois derivados de guanilhidrazona, ambos os derivados induziram mutações nas concentrações de 100µM e 1000µM, nos loci *his1-7* (mutação *missense*), *lys1-1* (mutação *forward*) e *hom3-10* (mutação *frameshift*) (Capítulo I, Tabela 3). Embora o mecanismo de ação destes derivados em nível de DNA ainda permaneça não elucidado, a possível explicação para estes resultados possa ser devido a

diferenças no metabolismo de bactérias e leveduras, em função da permeabilidade da membrana e desintoxicação em sistemas celulares, o que pode explicar os diferentes resultados obtidos nestes modelos biológicos (Brennan & Schiestl, 1998).

Quando empregamos a técnica do ensaio cometa na condição alcalina, o derivado 2,3-DMeB induziu danos ao DNA em todas as concentrações utilizadas, enquanto o derivado 3,4-DMeB induziu danos somente em altas concentrações (Capítulo I, Tabela 4). O aumento de quebras no DNA em células V79 e as mutações *frameshift* em levedura pode ser resultado da interação do DNA com estes derivados guanilhidrazonas, de uma forma direta ou indireta. O ensaio cometa alcalino detecta principalmente quebras simples e duplas na fita de DNA, eventos de reparo por excisão incompleto, sítios álcali-lábeis, danos oxidativos ao DNA, ligações cruzadas entre moléculas de DNA (Tice *et al.*, 2000; Lee & Steinert, 2003; Collins 2004; Burlinson *et al.*, 2007). No ensaio cometa neutro ambos os derivados, induziram um aumento significativo nos índices e nas frequências de danos no DNA em altas concentrações, sugerindo que ambos os compostos possam induzir quebras duplas no DNA (Capítulo I, Tabela 5).

Estes resultados estão em concordância com o resultado do teste de micronúcleos (Capítulo I, Tabela 7), uma vez que em altas concentrações ocorreu um aumento significativo das células com micronúcleos. Outros derivados de guanilhidrazonas também têm sido descritos como capazes de interagir com o DNA. Neste sentido, Santos-Filho *et al.* (1997), usando miméticos de cadeia B-DNA, demonstrou a interação preferencial do terminal guanidínico catiônico com os pares de bases A-T (Adenina-Timina) na região da fenda menor. Esta interação parece ocorrer principalmente através das pontes de hidrogênios entre a fração guanidínica da droga e os átomos N(3) endocíclico da *adenina*, e/ou O(2) exocíclico da *timina* da cadeia B-DNA. Além disto, outros trabalhos demonstraram que as guanilhidrazonas podem inibir as DNA topoisomerases (Walzer *et al.*, 1994; Ekelund *et al.*, 2001a).

Cabe ser ressaltado que foram observadas diferenças discretas para as duas guanilhidrazonas em células de levedura e cultura de células V79. No entanto, a 2,3-DMeB apresentou um efeito mais significativo em relação ao dano ao DNA, sugerindo que a posição do grupo substituinte metoxil pode interferir nos efeitos genotóxicos destes derivados (LaFrate *et al.*, 2008). O composto 3,4-DMeB apresenta um grau de liberdade rotacional na cadeia guanidínica em relação ao anel aromático maior que o composto 2,3-

DMeB, uma vez que os elétrons podem causar repulsa entre o par de oxigênio no grupo metoxil na posição 2 dos anéis aromáticos e as do nitrogênio na porção guanidínica (Figura 3). Esta repulsão torna o composto 2,3-DMeB com uma estrutura mais planar com uma redução rotacional, o que faz com que ele tenha uma melhor interação com o DNA ou iniba as topoisomerases.

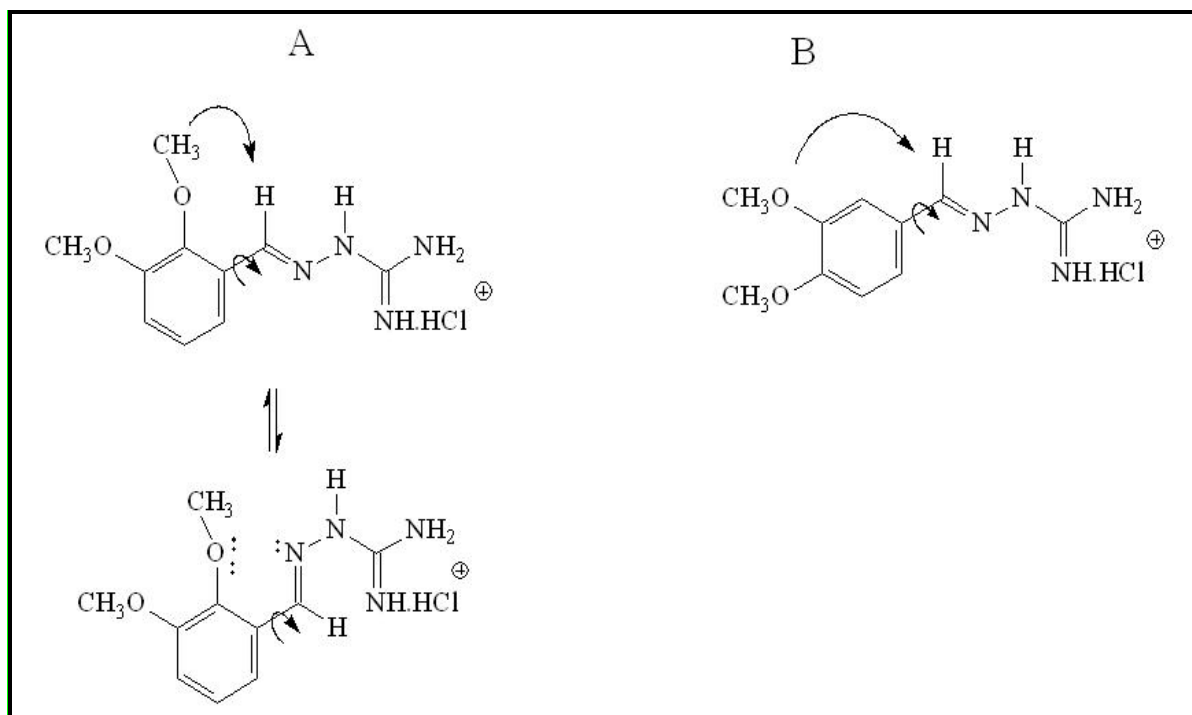


Figura 3. Mecanismo conformacional dos derivados de guanilhidrazonas, (A) 2,3-DMeB e (B) 3,4-DMeB.

3. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado utilizando a técnica do cometa modificado com enzimas envolvidas na remoção de danos oxidativos, as endonucleases III (Endo III) e a formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg), que detectam purinas e pirimidinas oxidadas. O tratamento com as enzimas de reparação de DNA antes da eletroforese permite a identificação do tipo de dano específico causado (Medina *et al.*, 2008; Viau *et al.*, 2009).

Verificou-se que os derivados de guanilhidrazonas 2,3-DMeB e 3,4-DMeB promoveram um importante aumento de danos ao DNA, sugerindo que estas quebras podem ser causadas por espécies reativas de oxigênio (Capítulo I, Figura 3). O aumento de radicais livres dentro das células é responsável, pelo menos em parte, pelas quebras do DNA, que foram observadas pelo ensaio cometa e teste de micronúcleos. Devido a estes resultados e juntamente com o fato de que este aumento foi observado em todas as concentrações utilizadas, pode-se sugerir que, os derivados de guanilhidrazonas induzem danos oxidativos do DNA. Como mencionado anteriormente o efeito citotóxico de muitos derivados das guanilhidrazonas tem sido associado pelo menos em parte com a perda da função mitocondrial, causando despolarização da membrana e induzindo EROS (Toninello *et al.*, 1999; Eklund *et al.*, 2001a; Eklund *et al.*, 2001b; Andreani *et al.*, 2005; Andreani *et al.*, 2006).

4. Atividades Biológicas

Entre as várias ações biológicas dos diversos derivados de guanilhidrazona que têm sido demonstradas na literatura, se incluem as atividades antifúngicas e anti-tripanosomas (Kelly *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2004; Papanastasiou *et al.*, 2008). Desta forma avaliamos a ação antifúngica por determinação da Concentração Mínima Inibitória, e a ação anti-tripanosoma através de sua toxicidade em cepas de *Trypanosoma cruzi*.

O derivado de guanilhidrazona 2,3-DMeB demonstrou uma ação antifúngica e anti-tripanosoma, mais pronunciada que o derivado 3,4-DMeB. A ação apresentada pode estar relacionada à produção EROs, pois a ação do benzonidazol, utilizado como controle positivo no teste anti-tripanosoma, está envolvida na produção de EROs e pode estar agindo através da indução de estresse oxidativo dentro do parasita (Pedrosa *et al.*, 2001). A

principal característica estrutural mostrada pelas guanilhidrazonas é o terminal catiônico; esta parte da estrutura sugere ser de grande importância nas propriedades microbianas apresentadas por esses compostos (Sundberg *et al.*, 1990). Santos-Filho *et al.* (1997), utilizando métodos de modelagem molecular, principalmente da metodologia de atracamento molecular (Docking), verificou a interação de guanilhidrazonas com o DNA. Posteriormente, estudos das interações de guanilhidrazonas com micelas de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) mostraram que a atividade destes compostos está relacionada com sua capacidade de diferenciar entre micelas catiônicas e aniônicas, sugerindo que o mecanismo de ação destes compostos pode ser através de interação com a membrana plasmática dos parasitas (Borges, 2001).

Messeder (1995) sintetizou guanilhidrazonas aromáticas mono e dissubstituídas e relacionou qualitativamente a estrutura destas com suas atividades anti-*Tripanossoma cruzi*. Todas as guanilhidrazonas foram sintetizadas sob a forma de cloridratos e testadas *in vitro* sobre as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. Os resultados sugeriram uma maior atividade nos compostos cuja cadeia lateral amino guanidínica possui rotação livre ou não coplanaridade com o anel aromático. Embora a estrutura 3,4-DMeB (Figura 3-A) possua uma liberdade rotacional da cadeia guanidínica maior em relação a 2,3-DMeB (Figura 3-B), esse último derivado também possui possibilidades rotacionais. Assim, o efeito biológico maior observado no derivado 2,3-DMeB possa estar relacionado a sua estrutura mais planar com redução rotacional, o que faz com que ele tenha uma melhor interação com o DNA ou iniba as topoisomerases, como mencionado anteriormente.

V CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo fornecem evidências de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos derivados de guanilhidrazona 2,3-DMeB e 3,4-DMeB, em sistemas procariotos e eucariotos:

- ✓ Os derivados 2,3-DMeB e 3,4-DMeB não induziram mutações frente às linhagens TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535 de *Salmonella typhimurium* em presença ou ausência de metabolização (S9-Mix), no entanto, mostraram uma resposta mutagênica para as linhagens N123 e XV185-14c de levedura, em fase exponencial de crescimento;
- ✓ As análises de citotoxicidade realizadas na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, indicam que os derivados 2,3-DMeB e 3,4-DMeB tem um moderado efeito citotóxico;
- ✓ Nas células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês em cultura (linhagem V79) as concentrações citotóxicas observadas para ambos os derivados foi acima de 100µM;
- ✓ Os índices e freqüências de danos sobre o DNA, detectados pelo ensaio cometa alcalino em células V79, na presença ou ausência do sistema de ativação metabólica (S9-Mix), indicam que os derivados de guanilhidrazona 2,3-DMeB e 3,4-DMeB induzem quebras de cadeias no DNA;
- ✓ Os índices e freqüências de danos sobre o DNA, detectados pelo ensaio cometa neutro em células V79, na ausência do sistema de ativação metabólica, indicam que os dois derivados de guanilhidrazonas, induzem quebras duplas no DNA em altas concentrações.
- ✓ O ensaio cometa modificado, com as enzimas ENDOIII e FPG em células V79, demonstra os derivados 2,3-DMeB e 3,4-DMeB geram danos oxidativos;

- ✓ Os derivados 2,3-DMeB e 3,4-DMeB aumentam a frequência de micronúcleos nas concentrações de 100 μ M e 1000 μ M;
- ✓ O derivado 2,3-DMeB mostra um efeito antifúngico e anti-tripanosoma.

Desta forma, pode-se concluir que as guanilhidrazonas 2,3-DMeB e 3,4-DMeB apresentaram estas respostas relacionadas principalmente ao potencial oxidativo ou ainda a sua possível interação com o DNA.

VI PERSPECTIVAS

Este estudo demonstrou algumas informações importantes a respeito das atividades dos derivados de guanilhidrazona 2,3-DMeB e 3,4-DMeB, e para complementar estas informações tem-se como perspectivas:

- ✓ Avaliar a influência dos derivados 2,3-DMeB e 3,4-DMeB na reparação do DNA utilizando linhagens *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e deficientes em enzimas envolvidas nas principais vias de reparação;
- ✓ Avaliar o efeito dos derivados de guanilhidrazona 2,3-DMeB e 3,4-DMeB, em linhagens tumorais;
- ✓ Determinar a atividade genotóxica em células em diferentes tecidos, tais como, cérebro, fígado, medula óssea e linfócitos de ratos tratados com ambos os derivados;
- ✓ Quantificar os níveis das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e também da glutathione, antes e depois do tratamento das células com os derivados 2,3-DMeB e 3,4-DMeB.

VII REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, A.; SKANDRANI, I.; KILANI, S.; NEFFATI, A.; SGHAIER, M.B.; BOUHLEL, I.; BOUBAKER, J.; AMMAR, R.B.; MAHMOUD, A.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Mutagenic, Antimutagenic, Cytotoxic and Apoptotic Activities of Extracts from *Pituranthos tortuosus*. *Drug Chem Toxicol*, 31:37-60, 2008.

ADRIS, P.; LOPEZ-ESTRANO, C.; CHUNG, K.T. The metabolic activation of 2-aminofluorine, 4-aminobiphenyl, and benzidine by cytochrome P-450-107S1 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicol In Vitro*, 21:1663-1671, 2007.

AHUJA, Y.R.; VIJAYALAKSHMI, V.; POLASA, K. Stem cell test: a practical tool in toxicogenomics. *Toxicology*, 231:1-10, 2007.

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*, 72:31-33, 1991.

ALLEN, D.D.; CAVIEDES, R.; CARDENAS, A.M.; SHIMAHARA, T.; SEGURA-AGUILAR, J.; CAVIEDES P.A. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 31:757-768, 2005

ALMEIDA, G.M.; DUARTE, T.L.; STEWARD, W.P.; JONES, G.D. Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro and in cancer patients using the alkaline comet assay. *DNA Repair (Amst)* 5:219-225, 2006.

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*, 8:2359-2366, 2000.

ANDREANI, A.; GRANAIOLA, M.; LEONI, A.; LOCATELLI, A.; MORIGI, R.; RAMBALDI, M.; GIORGI, G.; GARALIENE, V. Potential Antitumor Agents. 34.(1) Synthesis and Antitumor Activity of Guanylhydrazones from Imidazo[2,1-*b*]thiazoles and from Diimidazo[1,2-*a*:1,2-*c*]pyrimidine. *Anticancer Research* 24: 203-212, 2004.

ANDREANI, A.; GRANAIOLA, M.; LEONI, A.; LOCATELLI, A.; MORIGI, R.; RAMBALDI, M.; LENAZ, G.; FATO, R.; BERGAMINI, C.; FARRUGGIA, G. Potential antitumor agents. 37. Synthesis and antitumor activity of guanylhydrazones from imidazo[2,1-*b*]thiazoles and from the new heterocyclic system thiazolo[2',3':2,3]imidazo[4,5-*c*]quinoline. *J. Med. Chem.* 48:3085-3089, 2005.

ANDREANI, A.; BURNELLI, S.; GRANAIOLA, M.; LEONI, A.; LOCATELLI, A.; MORIGI, R.; RAMBALDI, M.; VAROLI, L.; FARRUGGIA, G.; STEFANELLI, C.; MASOTTI, L.; KUNKEL, M.W. Synthesis and Antitumor Activity of Guanylhydrazones from 6-(2,4-Dichloro-5-nitrophenyl) imidazo[2,1-*b*]thiazoles and 6-Pyridylimidazo[2,1-*b*]thiazoles. *J. Med. Chem.*, 49:7897-7901, 2006.

ANDREANI, A.; BURNELLI, S.; GRANAIOLA, M.; LEONI, A.; LOCATELLI, A.; MORIGI, R.; RAMBALDI, M.; VAROLI, L.; CALONGHI, N.; CAPPADONE, C.; VOLTATTORNI, M.; ZINI, M.; STEFANELLI, C.; MASOTTI, L.; SHOEMAKER, R.H. Antitumor Activity of New Substituted 3-(5-Imidazo[2,1-*b*]thiazolylmethylene)-2-indolinones and 3-(5-Imidazo[2,1-*b*]thiadiazolylmethylene)-2-indolinones: Selectivity against Colon Tumor Cells and Effect on Cell Cycle-Related Events. *J. Med. Chem.*, 51:7508-7513, 2008.

AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A. & STRUHL, K. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3^a ed. John Wiley & Sons, 1995.

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*, 28:56-63, 2005.

BARREIRO, E.J. A descoberta racional de fármacos. *Ciência Hoje*, 40:26-31, 2007.

BEZERRA, D. P.; MOURA, D. J.; D. J. ROSA, R.M.; VASCONCELLOS, M. C.; SILVA, A.C.R.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; HENRIQUES, J.P. A; COSTA-LOTUFO, L.V; SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkalamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells *Mutation Research*, 652:164–174, 2008.

BHAMRE, S.; GADEA, B.B.; KOYAMA, C.A.; WHITE, S.J.; FOWLER, R.G. An aerobic recA-, umuC-dependent pathway of spontaneous base-pair substitution mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 473:229-247, 2001.

BOEIRA, J. M.; VIANA, A. F.; PICADA, J. N.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research*, 500: 39-48, 2002.

BOLOGNESI, C.; BUSCHINI, A.; BRANCHI, E.; CARBONI, P.; FURLINI, M.; MARTINO, A.; MONTEVERDE, M.; POLI, P.; ROSSI, C. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Sci Total Environ*, 333:127-136, 2004.

BOONE, C.; BUSSEY, H.; ANDREWS, B.J. Exploring genetic interactions and networks with yeast. *Nat Rev Genet* 8:437-449, 2007.

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*, 62:9-14, 2001.

BRADLEY, M.O.; BHUYAN, B.; FRANCIS, M.C.; LANGENBACH, R.; PETERSON, A. & HUBERMAN, E. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. *Mutation Research*, 87: 81-142, 1981.

BRENDEL, M. & HENRIQUES, J.A.P. The pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutation Research*, 489: 79–96, 2001.

BRENDEL, M.; BONATTO, D.; STRAUSS, M.; REVERS, L.F.; PUNGARTNIK, C.; SAFFI J.; HENRIQUES, J.A.P. Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 544:179-193, 2003.

BRENNAN, R.J. & SCHIESTL, R.H. Free radicals generated in yeast by the *Salmonella* test negative carcinogens benzenes, urethane, thiourea and auramine O. *Mutation Research*, 403: 65-73, 1998.

BRUN, R.; BUHLER, Y.; SANDMEIER, U. ; KAMINSKY, R.; BACCHI, C. J.; RATTENDI, D.; LANE, S.; CROFT, S.L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V.; CARAVATTI, G.; METT, H. In vitro trypanocidal activities of new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 40:1442-1447, 1996.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; COLLINS, A.R.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V. ; HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res*, 627:31-35, 2007.

CAVALCANTI, B.C.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; MORAES, M.O.; ARAUJO E.C.C.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P.; COSTA-LOTUFO, L.V. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 46:388-392, 2008.

CHANG, K.P.; STEIGER, R.F.; DAVE, C.; CHENG, Y.C. Effects of methylglyoxal bis(guanylhydrazone) on trypanosomatid flagellates: inhibition of growth and nucleoside incorporation in *Trypanosoma brucei*. *J. Protozool*, 25:145-149, 1978.

CHENG, L.L.; COLLIER, D.C.; WILKIE, D. Effect of antioxidants on the mitochondrial activity and toxicity of the cancer drug methylglyoxal bis (guanylhydrazone) in yeast and mammalian cells. *Cancer Lett.*, 51:213-220, 1990.

CHENG, W.H.; KUSUMOTO, R.; *et al.*, Collaboration of Werner syndrome protein and BRCA1 in cellular responses to DNA interstrand cross-links. *Nucleic Acids Res*, 34:2751-2760, 2006.

CHRISTEN, S.; GEE, P.; AMES, B.N. Mutagenicity of nitric oxide in base pair-specific *Salmonella* tester strains: TA7000 series. *Methods Enzymol* 269:267-278, 1996.

CHUNG, K.T.; KIRKOVSKY, L.; KIRKOVSKY, A.; PURCELL, W.P. Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: quantitative structure-activity relationships. *Mutation Research*, 387:1-16, 1997.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 26:249-261, 2004.

COLLINS, A.R.; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROSVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ K. & VAUGHAN N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 30: 139-146, 1997.

COLOMBO, M. & PERETTO, I. Chemistry strategies in early drug discovery: an overview of recent trends. *Drug Discovery Today*, 13:15-16, 2008.

DAVIDSON, K.; PETIT, T.; IZBICKA, E.; KOESTER, S.; VON HOFF, D.D. Mitoguazone induces apoptosis via a p53-independent mechanism. *Anticancer Drugs*, 9:635-640, 1998.

DE COPPI, P.; BARTSCH, G. JR. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 25:100-106, 2007.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; McCARROLL, N.E.; MAUER, I. & VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, 521: 121-135, 2002.

DEBNATH, J. & BRUGGE, J.S. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer*, 5:675-688, 2005.

DOYLE, A. & GRIFFITHS, J.B. 'Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology.' (Wiley: New York) 1999.

EKELUND, S.; NYGREN, P.; LARSSON, R. Guanidino-containing drugs in cancer chemotherapy: biochemical and clinical pharmacology. *Biochemical Pharmacology*, 61:1183-1193, 2001a.

EKELUND, S.; SJOHOLMB, A.; NYGREN, P.; BINDERUP, L.; LARSSON, R. Cellular pharmacodynamics of the cytotoxic guanidino-containing drug CHS 828. Comparison with methylglyoxal-bis(guanylhydrazone). *European Journal of Pharmacology*, 418:39-45, 2001b.

ENBLAD, G.; HAGBERG, H.; GLIMELIUS, B. Methyl-GAG, ifosfamide, methotrexate and etoposide (MIME) as salvage therapy for non-Hodgkin's lymphomas: a Swedish national prospective study. Swedish Lymphoma Study Group. *Acta Oncol*, 35:165-170, 1996.

ENBLAD, G.; HAGBERG, H.; GUSTAVSSON, A.; GLIMELIUS, B. Methyl-GAG, ifosfamide, methotrexate and etoposide (MIME) as salvage therapy for Hodgkin's disease: a prospective study. *Eur J Haematol*, 60:166-171, 1998.

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

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, 455:81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.*, 600:58-66, 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*, 2:1084-1104, 2007.

FENG, M.R. Assessment of blood-brain barrier penetration: in silico, in vitro and in vivo. *Curr. Drug. Metab.*, 3:647-657, 2002.

FREEDLANDER, B.L.; FRENCH, F.A. Carcinostatic action of polycarbonyl compounds and their derivatives. II. Glyoxal bis (guanylhydrazone) and derivatives. *Cancer Res*, 18:360-363, 1958.

GARCIA, O.; ROMERO, I.; GONZALEZ, J.E.; MANDINA, T. Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutat. Res.*, 627:186-190, 2007.

GEDIK, C.M.; WOOD, S.G.; COLLINS, A.R.; Measuring oxidative damage to DNA; HPLC and the comet assay compared. *Free Radic Res*, 29:609-615, 1998.

GIOVANNELLI, L.; PITOZZI, V.; RIOLO, S.; DOLARA, P. Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. *Mutat. Res.*, 538:71-80, 2003.

GOFFEAU, A.; BARREL, B.G; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D; JAQC, C.; JOHNSTON, M; LOUIS, E.J; MEWES, H.W; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. *Science*, 274:563-567, 1996.

GOLDBARD, S. Bringing primary cells to mainstream drug development and drug testing. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 9:110-116, 2006.

GOLL, J. & UETZ, P. The elusive yeast interactome. *Genome Biol*, 7:223, 2006.

GOODELL, M.A. Stem cells: is there a future in plastics? *Curr Opin Cell Biol*, 13:662-665, 2001.

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. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15:49-61, 2002.

GOTTFRIED, E.; KUNZ-SCHUGHART, L.A.; ANDREESEN, R.; KREUTZ, M. Brave little world: spheroids as an in vitro model to study tumor-immune-cell interactions. *Cell Cycle*, 5:691-695, 2006.

GROSICKA, E.; SADURSKA, B.; SZUMILO, M.; GRZELA, T.; LAZARCZYK, P.; NIDERLA-BIELINSKA, J.; RAHDEN-STARON, I. Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in Chinese hamster fibroblasts. *Int. Immunopharmacol*, 5:1945-1956, 2005.

GUECHEVA, T.; HENRIQUES, J.A.P.; ERDTMANN, B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat Res*, 497:19-27, 2001.

HAKURA, A.; SHIMADA, H.; NAKAJIMA, M.; SUI, H.; KITAMOTO, S.; SUZUKI, S.; SATOH, T. Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis*, 20:217-228, 2005.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol*, 39:843-858, 2001.

HASHIMOTO, Y.; HIBASAMI, H.; TAMAKI, S.; KAMEI, A.; IKOMA, J.; KAITO, M.; IMOTO, I.; WATANABE, S.; NAKASHIMA, K.; ADACHI, Y. Induction of apoptotic cell death in human hepatocellular carcinoma SK-HEP-1 cells by a polyamine synthesis inhibitor, methylglyoxal bis(cyclopentylamidino)hydrazone. *Anticancer Drugs*, 10:323-327, 1999.

HELGASON, C. & MILLER, C. 'Basic Cell Culture Protocols.' (Humana Press: Totowa), 2004.

HENRIQUES, J.A.P; BROZMANOVA, J.; BRENDEL, M. Role of PSO genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* 39:185-196, 1997.

HOEFNAGEL, C.A.; VOUTE, P.A.; DE KRAKER, J.; MARCUSE, H.R. Radionuclide diagnosis and therapy of neural crest tumors using iodine-131 metaiodobenzylguanidine. *J Nucl Med*, 28:308-314, 1987.

HOLMES, B.; BROGDEN, R.N.; HEEL, R.C.; SPEIGHT, T.M.; AVERY, G.S. Guanabenz. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. *Drugs*. 3:212-229, 1983.

HORSCROFT, N.; LAI, V.C.; CHENEY, W.; YAO, N.; WU, J.Z.; HONG, Z.; ZHONG, W. Replicon cell culture system as a valuable tool in antiviral drug discovery against hepatitis C virus. *Antivir Chem Chemother*, 16:1-12, 2005.

HUANG, M.R.; RIO, A.G.; NICOLAS, A.; KOLODNER, R.D. A genome wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100 (20):11529-11534, 2003.

HUANG, W.; LAI, C.; CHENG, Y. Evaluation of extracellular products and mutagenicity in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. *Science Total Environment* 377:214-223, 2007.

JANNE, J.; ALHONEN, L.; LEINONEN, P. Polyamines: from molecular biology to clinical applications. *Ann Med*, 23:241-259, 1991.

KALWEIT, S.; UTESCH, D.; VON DER HUDE, W.; MADLE, S. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells: comparison of three different test approaches. *Mutat Res*. 439:183-190, 1999.

KELLY, J.M.; QUACK, G.; MILES, M.M. *In vitro* and *In vivo* Activities of Aminoadamantane and Aminoalkylcyclohexane Derivatives against *Trypanosoma brucei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:1360-1366, 2001.

KEMENY, M.M.; BOTCHKINA, G.I.; OCHANI, M.; BIANCHI, M.; URMACHER, C.; TRACEY, K.J. The tetravalent guanlylhydrazone CNI-1493 blocks the toxic effects of interleukin-2 without diminishing antitumor efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:4561-4566, 1998.

KNIGHT, A.W.; BILLINTON, N.; CAHILL, P.A.; SCOTT, A.; HARVEY, J.S.; ROBERTS K.J.; TWEATS, D.J.; KEENAN, P.O.; WALMSLEY, R.M. An analysis of results from 305 compounds tested with the yeast RAD54-GFP genotoxicity assay (GreenScreen GC)-including relative predictivity of regulatory tests and rodent carcinogenesis and performance with autofluorescent and coloured compounds. *Mutagenesis*, 22:409-416, 2007.

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.

KURTZ, J.E.; DUFOUR, P.; DUCLOS, B.; BERGERAT, J.P.; EXINGER, F. *Saccharomyces cerevisiae*: an efficient tool and model system for anticancer research. *Bull Cancer*. 91:(2):133-139, 2004.

LAFON, A.; CHANG, C.S.; SCOTT, E.M.; JACOBSON, S.J.; PILLUS, L. MYST opportunities for growth control: yeast genes illuminate human cancer gene functions. *Oncogene*, 26:5373-5384, 2007.

LAFRATE, A.L.; GUNTHER, J.R.; CARLSON, K.E.; KATZENELLENBOGEN, J.A. Synthesis and biological evaluation of guanylhydrazone coactivator binding inhibitors for the estrogen receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16:10075-10084, 2008.

LEE, R.F. & STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res*, 544:43-64, 2003.

LEVINE, A.M.; TULPUL, A.; TESSMAN, D.; KAPLAN, L.; GILES, F.; LUSKEY, B.D.; SCADDEN, D.T.; NORTHFELT, D.W.; SILVERBERG, I.; WERNZ, J.; ESPINA, B.; VON HOFF, D. Mitoguzone therapy in patients with refractory or relapsed AIDS-related lymphoma: results from a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol*, 15:1094-1103, 1997.

LOESBERG, C.; VAN ROOJI, H.; ROMIJN, J.C.; SMETS, L.A. Mitochondrial effects of the guanidino group-containing cytostatic drugs, m-iodobenzylguanidine and methylglyoxal bis (guanylhydrazone). *Biochem Pharmacol*, 42:793-798, 1991.

MACGREGOR, J.T.; CASCIANO, D.; MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, 455:3-20, 2000.

MACHADO, M.S.; VILLELA, I.V.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; SALVADOR, M.; LOPES, N.P.; BRAGA, A.L.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A. 3'-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: a new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities. *Mutat Res*, 673(2):133-140, 2009.

MARIS, A.F.; ASSUMPCAO, A.L.; BONATTO, D.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet*, 39:137-149, 2001.

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

MARQUES, M.P.; GIL, F.P.; CALHEIROS, R.; BATTAGLIA, V.; BRUNATI, A.M.; AGOSTINELLI, E.; TONINELLO, A. Biological activity of antitumoural MGBG: the structural variable. *Amino Acids*, 34:555-564, 2007.

MARTINS, T.L.C.; RAMALHO, T.C.; FIGUEROA, V.J.; FLORES, A.F.C.; PEREIRA, C.M.P. Theoretical and experimental ¹³C and ¹⁵N NMR investigation of Guanylhydrazones in solution. *Magnetic Resonance In Chemistry*, 41:983-988, 2003

MARTINS, T.L.C.; RAMALHO, T.C.; FRANCA, T.C.C.; FIGUEROA, V.J. Synthesis of Guanylhydrazones under Microwave Irradiation. *Synthetic Communications* 34:3891-3899, 2004.

MARTINS, T.L.C. Síntese de guanilhidrazonas, atividade antibiótica e estudos de interação com DNA por RMN. Tese de doutorado, Instituto Militar de Engenharia – Rio de Janeiro, 2004.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring *Biochimie* 88:1515–1531, 2006.

MEDINA, L. F. C.; VIAU, C.M. ; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; STEFANI, V.; BRANDELLI, A.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of aminohydroxynaphthoquinones in bacteria, yeast, and Chinese hamster lung fibroblast cells *Mutation Research* 650:140-149, 2008.

MENACHO-MARQUEZ, M. & MURGUIA, J.R. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol*, 9:221-228, 2007.

MERZ, S.; HAMMERMEISTER, M.; ALTMANN, K.; DURR, M.; WESTERMANN, B. Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biol Chem*, 388:917-926, 2007.

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*, 5(24):3079-3084, 1995.

HOU, M.; LU, W.; HUANG, C.; FAN, R.; YUANN, J. P. Effects of polyamines on the DNA-reactive properties of dimeric mithramycin complexed with cobalt (II): Implications for anticancer therapy. *Biochemistry*, 2009. Downloaded from <http://pubs.acs.org> on April 20, 2009. (no prelo)

MIHICH, E.; Current studies with methylglyoxal-bis(guanylhyazone). *Cancer Research*, 23:1375-1389, 1963.

MIORELLI, S.T.; ROSA, R. M.; MOURA, D.J.; ROCHA, J.C.; LOBO, L.A.C.; HENRIQUES, J.A.P.; SAFFI, J. Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis*, 23:93-99, 2008.

MITCHELL, B. A.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. QacA Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus*: Comparative Analysis of Resistance to Diamidines, Biguanidines, and Guanylhyazones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42:(2):475-477, 1998.

MIYAGOSHI, M. & FUJIKAWA-YAMAMOTO, K. The reversion to diploid cells from established triploid V79 cells. *Cell Prolif*, 39:421-428, 2006.

MORTELMANS, K. & RICCIO, E.S. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutat Res*, 455:61-69, 2000.

MORTELMANS, K. & ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*, 455:29-60, 2000.

MOURA D. J.; RICHTER M. F.; BOEIRA J M.; HENRIQUES J.A.P.; SAFFI J. Antioxidant properties of b-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, 22(4):293-302, 2007.

OKAMOTO, T. Safety of quercetin for clinical application (Review). *Int J Mol Med*, 16:275-278, 2005.

OLIVE, P.L.; BANATH, J.P.; The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*, 1:23-29, 2006.

OSTLING, O; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123:291-298, 1984.

PAPANASTASIOU I., TSOTINIS A., KOLOCOURIS N., PRATHALINGAM S. R., AND KELLY J. M. (2008) Design, Synthesis, and Trypanocidal Activity of New Aminoadamantane Derivatives. *J. Med. Chem* 51:1496–1500.

PARRISH, J.R.; GULYAS, K.D.; FINLEY, R.L.JR. Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. *Curr Opin Biotechnol*, 17:387-393, 2006.

PEDROSA, R.C.; DE BEM, A.F.; LOCATELLI, C.; GEREMIAS, R.; WILHELM FILHO D. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Rep.*, 6(4):265-70, 2001.

PEGG, A.E.; MCCANN, P.P. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol*, 243: C212-221, 1982.

PLAZAR, J.; HRELJAC, I.; PIRIH, P.; FILIPIC, M. ;GROOTHUIS, G.M. Detection of xenobiotic-induced DNA damage by the comet assay applied to human and rat precision-cut liver slices. *Toxicol In Vitro*, 6:1134-1142, 2007.

QUILLARDET, P.; HOFNUNG, M. The SOS chromotest: a review. *Mutat Res*, 297:235-279, 1993.

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

REGENASS, U.; CARAVATTI, G.; METT, H.; STANEK, J.; SCHNEIDER, P.; MULLER, M.; MATTER, A.; VERTINO, P.; PORTER, C.W. New S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors with potent antitumor activity. *Cancer Res*, 52:4712-4718, 1992.

REIFFERSCHIED, G.; HEIL, J. Validation of the SOS/umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutat Res*, 369:129-145, 1996.

RIZZO, J.; LEVINE, A.M.; WEISS, G.R.; PEARCE, T.; KRAYNAK, M.; MUECK, R.; SMITH, S.; VON HOFF, D.D.; KUHN, J.G. Pharmacokinetic profile of Mitoguazone (MGBG) in patients with AIDS related non-Hodgkin's lymphoma. *Invest New Drugs*, 14:227-234, 1996.

ROSA, R.M.; SULZBACHER, K.; PICADA, J.N.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutat Res*, 563:107-115, 2004.

ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; ROMANO, A.C.S.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res*, 631:44-54, 2007a.

ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; MELECCHI, M.I.; SANTOS, R.S.; RICHTER, M.F.; CAMARÃO, E.B.; HENRIQUES, J.A.P.; RAMOS, A.L.L.P.; SAFFI, J. Protective effects of Hibiscus tiliaceus L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicology in Vitro*, 21:1442-1452, 2007b.

SAKAI, A.; IWASE, Y.; NAKAMURA, Y.; SASAKI, K.; TANAKA, N.; UMEDA, M. Use of a cell transformation assay with established cell lines, and a metabolic cooperation assay with V79 cells for the detection of tumour promoters: a review. *Altern Lab Anim*, 30:33-59, 2002.

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*, 7(13):1797-1802, 1997.

SATOH, N.; HIBASAMI, H.; MORI, K.; KANEKO, H.; WAKABAYASHI, H.; HIRATA, K.; SONODA, J.; NAKASHIMA, K.; UCHIDA, A. Growth inhibition of human osteosarcoma HuO9 cells by methylglyoxal bis(cyclopentylamidinohydrazone) in vitro and in vivo. *Oncol Rep*, 6:627-630, 1999.

SAUVAIGO, S.; PETEC-CALIN, C.; CAILLAT, S.; ODIN, F.; CADET, J. Comet assay coupled to repair enzymes for the detection of oxidative damage to DNA induced by low doses of gamma-radiation: use of YOYO-1, low-background slides, and optimized electrophoresis conditions. *Anal Biochem*, 303:107-109, 2002.

SCHEUENPFLUG, J.; KREBSFANGER, N.; DOEHMER, J. Heterologous co-expression of human cytochrome P450 1A2 and polymorphic forms of N-acetyltransferase 2 for studies on aromatic amines in V79 Chinese hamster cells. *Altern Lab Anim*, 33:561-577, 2005.

SHAPIRO, T.A.; ENGLUND, P.T. Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:950-954, 1990.

SHELBY, M.D. The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. *Mutat Res*, 204:3-15, 1988.

DA SILVA, J. ; MORAES, C. R. ; HEUSER, V. D. ; ANDRADE, V. ; SILVA, F. R. ; KVITKO, K. ; EMMEL, V. ; ROHR, P. ; BORDIN, L. D. ; ANDREAZZA, A. C. ; SALVADOR, M. ; HENRIQUES, J. A. P. ; ERDTMANN, B. Evaluation of Genetic Damage in a Brazilian Population Occupationally Exposed to Pesticides and its Correlation with Polymorphisms in Metabolizing Genes. *Mutagenesis*, 23:415-422, 2008.

SIMON, J.A.; SZANKASI, P.; NGUYEN, D.K.; LUDLOW, C.; DUNSTAN, H.M.; ROBERTS, C.J.; JENSEN, E.L.; HARTWELL, L.H.; FRIEND, S.H. Differential toxicities of anticancer agents among DNA repair and checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res.*, 60:328-333, 2000.

SMETS, L.A.; BOUT, B.; WISSE, J. Cytotoxic and antitumor effects of the norepinephrine analogue meta-iodo-benzylguanidine (MIBG). *Cancer Chemother Pharmacol*, 21:9-13, 1988.

SOARES, D.G.; POLETTO, N.P.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, J.A.P. Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. *Biochemical Pharmacology*, 70:59-69, 2005.

SPEIT, G.; SCHUTZ, P.; HOFFMANN, H. Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. *Mutat. Res.*, 626:42-47, 2007.

SUNDBERG, R.J.; DAHLHAUSEN, D.J.; MANIKUMAR, G.; MAVUNKEL, B.; BISWAS, A.; SRINIVASAN, V.; MUSALLAM, H.A.; REID, W.A.JR.; AGER, A.L. Cationic antiprotozoal drugs. Trypanocidal activity of 2-(4'-formylphenyl) imidazo [1,2-a] pyridinium guanylhydrazones and related derivatives of quaternary heteroaromatic compounds. *J. Med. Chem.*, 33:298-307, 1990.

TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch. *Quim. Nova*, 27:631-639, 2004.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell

gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.*, 35(3):206-221, 2000.

TONINELLO, A.; VIA, L.D.; NOTO, V.D.; MANCON, M. The Effects of Methylglyoxal-bis(guanylhydrazone) on Spermine Binding and Transport in Liver Mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, 58:899-1906, 1999.

TOUSSAINT, M. & CONCONI, A. High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents. *Nat Protoc*, 1:1922-1928, 2006.

TOUSSAINT, M.; LEVASSEUR, G.; GERVAIS-BIRD, J.; WELLINGER, R.J.; ELELA, S.A.; CONCONI, A. A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures. *Mutat Res*, 606:92-105, 2006.

TRONCONE, L.; RUFINI, V. 131I-MIBG therapy of neural crest tumours (review). *Anticancer Res*, 17:1823-1831, 1997.

ULRICH, P. & CERAMI, A. Trypanocidal 1,3-arylene diketone bis (guanylhydrazone). Structure-activity relationships among substituted and heterocyclic analogues. *J Med Chem*, 27:35-40, 1984.

VAN NOORT, J.M. Human glial cell culture models of inflammation in the central nervous system. *Drug Discov Today*, 11:74-80, 2006.

VIAU, C. M.; GUECHEVA, T.N.; SOUSA, F. G.; PUNGARTNIK, C.; BRENDDEL, M.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. SnCl₂-induced DNA damage and repair inhibition of MMS-caused lesions in V79 Chinese hamster fibroblasts. *Genotoxicity and carcinogenicity*, 2009. (no prelo)

VIEGAS, JR.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, 29:326-337, 2006.

VILLELA, I.; DE OLIVEIRA, I.; SILVEIRA, J.; DIAS, J.; HENRIQUES, J.; DA SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628:76-86, 2007.

VON DER, H. W.; KALWEIT, S. In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutat. Res.*, 468:137-163, 2000.

WALMSLEY, R.M. Genotoxicity screening: the slow march to the future. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 1:261-268, 2005.

WALZER, P.D.; FOY, J.; RUNCK, J.; STEELE, P.; WHITE, M.; KLEIN, R.S.; OTTER, B.A.; SUNDBERG, R.J. Guanylhydrazones in therapy of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunosuppressed rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 38:2572-2576, 1994.

WANG, A.S.; RAMANATHAN, B.; CHIEN, Y.H.; GOPARAJU, C.M.; JAN, K.Y. Comet assay with nuclear extract incubation. *Anal Biochem*, 337:70-75, 2005.

WANG, L.; ROY, S.K.; EASTMOND, D.A. Differential cell cycle-specificity for chromosomal damage induced by merbarone and etoposide in V79 cells. *Mutat. Res.*, 616:70-82, 2007.

WARRELL, R.P.JR.; BURCHENAL, J.H. Methylglyoxal-bis(guanylhydrazone) (Methyl-GAG): current status and future prospects. *J. Clin. Oncol.*, 1:52-65, 1983.

WATSON, W.P.; MUNTER, T.; GOLDING, B.T. A new role for glutathione: protection of vitamin B12 from depletion by xenobiotics. *Chem. Res. Toxicol.*, 17:1562-1567, 2004.

WENYAN, W.U.; DIPTESH, S.I.L.; SZOSTAK, M. L.; MALLADI, S.S.; WARSHAKOON, H.J.; KIMBRELL, M. R.; CROMER, J. R.; DAVID, S.A. Structure-activity relationships of lipopolysaccharide sequestration in guanylhydrazone -bearing lipopolyamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17:709-715, 2009.

WIELAND, D.M.; WU, J.; BROWN, L.E.; MANGNER, T.J.; SWANSON, D.P.; BEIERWALTES, W.H. Radiolabeled adrenergi neuron-blocking agents: adrenomedullary imaging with [¹³¹I]iodobenzylguanidine. *J. Nucl. Med.*, 21:349-353, 1980.

WISE, C. 'Epithelial cell culture protocols.' (Humana Press: Totowa), 2002.

WOGAN, G.N.; HECHT, S.S.; FELTON, J.S.; CONNEY, A.H.; LOEB, L.A. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 14:473-486, 2004.

WHO, World Health Organization, Human African trypanosomiasis, Control of human african trypanosomiasis: a strategy for the african region. Capturado em http://www.who.int/trypanosomiasis_african/en/, 2005

ZELJEZIC, D.; GARAJ-VRHOVAC, V.; PERKOVIC, P. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicol. In Vitro*, 20:923-935, 2006.

ZIMMERMANN, F.K. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 31:71-86, 1975.

ZIMMERMANN, F.K.; VON BORSTEL, R.C.; VON HALLE, E.S.; PARRY, J.M.; SIEBERT, D.; ZETTERBERG, G.; BARALE, R.; LOPRIENO, N. Testing of chemicals

for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 133:199-244,1984.

ZIMMERMANN, FK & VIG, B.K. Mutagen specificity in the induction of mitotic crossing-over in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 139:255-268, 1975.

ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicol In Vitro*, 18:153-163, 2004.

ANEXO I

CURRÍCULUM VITAE

PINHATTI, V.R.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Valéria Rodrigues Pinhatti

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil, 02 de julho de 1973

Endereço Profissional: Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43422, Sala 210

Telefone Profissional: (51) 3308-7602

E-mail: valeria@hotmail.com

2. FORMAÇÃO

1999-2005 - Graduação em ciências biológicas - Universidade Luterana do Brasil - ULBRA.

3. ESTÁGIOS

2005-2006 - Estágio voluntário – Laboratório de Genética Toxicológica - ULBRA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana da Silva

2007-2009 - Apoio Técnico de Laboratório - Laboratório de Reparação de DNA

de Eucariotos - Departamento de Biofísica, UFRGS

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Bolsa: CNPq

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

PINHATTI, V.R.; ALLGAYER, MARIÂNGELA DA C ; BREYER, ADRIANA S ; PEREIRA, ROSECLER A. ; SILVA, JULIANA DA . Determinação de danos basais no DNA de araras canindé (*Ara ararauna*) através do teste de micronúcleos: uma ferramenta

na avaliação da saúde animal e seu uso no biomonitoramento da poluição ambiental.. Acta Scientiae Veterinariae, v. 34, p. 313-317, 2006.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. PINHATTI, V. ; ROSA, R.M. ; MARTINS, T.L.C. ; SILVA, Juliana da ; HENRIQUES, J.A.P. . Avaliação da genotoxicidade de derivados guanil hidrazonas com atividade tripanocida e antifúngica.. In: IX Reunião do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - UFRGS, 2007, Porto Alegre. Resumos - IX Reunião do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - UFRGS, 2007.
2. NUNES, E. ; PINHATTI, V. ; SANTOS, A. M. P. V. ; MARTINS, I. A. ; LOPES, P. T. C. ; CHILATZ, B. ; SILVA, Juliana da . Avaliação de lesões ao DNA ocasionadas por atividade anaeróbica.. In: VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental., 2007, Mangaratiba. Revista Brasileira de Toxicologia, 2007. v. 20. p. 123-123.
3. OLIVEIRA, J. V. D. ; DIAS, J. ; PINHATTI, V. ; SILVA, Juliana da . Genotoxic evaluation of smelters occupationally exposed to copper using the comet assay.. In: VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental., 2007, Mangaratiba. Revista Brasileira de Toxicologia, 2007. v. 20. p. 123-123.
4. ROSA, P. D. C. ; NUNES, E. ; MARTINS, T.L.C. ; PEREIRA, Rosecler A. ; PINHATTI, V. ; SILVA, F. R. ; SEEFELD, E. ; SILVA, Juliana da . Avaliação do potencial genotóxico de guanilhidrazonas em camundongos.. In: VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental., 2007, Mangaratiba. Revista Brasileira de Toxicologia, 2007. v. 20. p. 25-25.
5. PINHATTI, V. ; ALLGAYER, Mariângela da C ; SILVA, Juliana da . Araras canindé (Ara ararauna): Bioindicador de alterações ambientais.. In: XXX CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 2006, Brasília. Livro de Resumos - XXX CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 2006.
6. PINHATTI, V. ; ALLGAYER, Mariângela da C ; SILVA, Juliana da . Avaliação de danos basais no DNA de araras canindé (Ara ararauna) através do teste de micronúcleos.. In: XVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA & XIV FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, UFRGS, 2005, Porto Alegre. Livro de Resumos - XVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA & XIV FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, UFRGS. Porto Alegre : Editora da Universidade UFRGS, 2005. p. 167-167.
7. PINHATTI, V. ; ALLGAYER, Mariângela da C ; SILVA, Juliana da . Teste de micronúcleos para detecção de danos basais em araras canindé (Ara ararauna).. In: XI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, ULBRA, 2005, 2005, Canoas. Livro de

Resumos XI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, ULBRA, 2005. Canoas : Editora da Ulbra, 2005. p. 431-431.

8. PEDRALLI, V. ; SOLLARI, M.I.G. ; COSTA, E. S. ; SANDER, M. ; PINHATTI, V. ; LEBOUTE, A.P.M. ; SILVA, Juliana da . O uso da sexagem por DNA como ferramenta em estudos de conservação em aves.. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, ULBRA, 2005, 2005, Canoas. Livro de Resumos - SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, ULBRA, 2005. Canoas : Editora da Ulbra, 2005. p. 317-317.