ANA LAURA NICOLETTI CARVALHO

**Efeitos dos ácidos anacárdicos no sistema respiratório de
camundongos submetidos à instilação intranasal de
partículas resultantes da combustão de diesel**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Patologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Mauad

São Paulo

2011

ANA LAURA NICOLETTI CARVALHO

**Efeitos dos ácidos anacárdicos no sistema respiratório de
camundongos submetidos à instilação intranasal de
partículas resultantes da combustão de diesel**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Patologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Mauad

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Ana Laura Nicoletti

Efeitos dos ácidos anacárdicos no sistema respiratório de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel / Ana Laura Nicoletti Carvalho-- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Thais Mauad.

Descritores: 1.Ácidos anacárdios 2.Anacardium occidentale 3.Antioxidantes
4.Diesel exaurido 5.Inflamação pulmonar 6.Poluição do ar

USP/FM/DBD-051/11

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com todo carinho às pessoas que, mesmo distantes, que me ajudaram e inspiraram nesta longa caminhada...

*À minha mãe, **Sônia**, a pessoa mais importante na minha vida, que acreditou sempre que eu poderia chegar onde quisesse. Posso dizer que sem seu apoio irrestrito, isso não seria possível. Obrigada pelo exemplo de mãe e pai, mulher e profissional incríveis!*

*Aos meus irmãos **Abrahamo** e **Mauro**, pelo amor fraterno em todos os momentos.*

*Ao meu fiel companheiro, **Xarope**, o melhor presente: seu amor canino absolutamente incondicional.*

*Ao meu marido, **Saulo**, sua tranquilidade, carinho e amor me fortaleceram todos estes anos aqui em São Paulo. Obrigada por fazer a minha vida repleta de momentos felizes não importa onde estejamos.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Thais Mauad, minha orientadora, meu agradecimentos sinceros pelas oportunidades e ensinamentos profissionais e pessoais todos estes quatro anos de doutorado.

À Prof^a Dr^a Marisa Dolhnikoff e ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva pelo incentivo e apoio preciosos.

Ao Prof. Dr. Milton Martins e ao Prof. Dr. Paulo Saldiva, agradeço pelo carinho, simpatia e pela participação ativa e contribuição inestimável durante todas as fases do projeto de pesquisa.

À Prof^a Dr^a Maria Teresa Trevisan, química, idealizadora deste projeto juntamente com a minha orientadora.

Aos Professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Dr^a Tânia Marcourakis, Dr^a Sandra Farsky, Dr. Ricardo Fock e Dr^a Primavera Borelli. Agradeço pela seriedade e profissionalismo na contribuição das análises dos estudos de toxicidade e atividades enzimáticas dos ácidos anacárdicos.

À minha amiga e colega pós-graduação Raquel Annoni, por ter me apresentado a Dr^a Thais Mauad e, assim, contribuindo para meu ingresso neste grupo de pesquisa. Pela sua amizade sincera e companheirismo em todos os momentos nos nossos anos de doutorado juntas.

Às colegas de Pós-graduação Larissa Helena Lobo Torres e Ana Carolina Durão pela amizade, colaboração e profissionalismo nas análises de estresse oxidativo.

Aos funcionários do LIM 05, LIM 20, Museu de Imagens e Laboratório de Imunohistoquímica, em especial à Maria Cristina e Ângela pelo cuidado e disposição na preparação das inúmeras reações imunohistoquímicas.

A todos os colegas da Pós-Graduação do Grupo da Patologia Pulmonar, em especial: Tatiana Lanças, Diógenes Seraphim Ferreira, Ellen Caroline do Nascimento, Maína Morales, Raquel Annoni, Ruy de Camargo Pires Neto, Kelly Yoshizaki e George Castro Mello. É ótimo fazer parte deste grupo onde compartilhamos tudo: experiências profissionais e pessoais. Obrigada por tudo.

Aos co-autores deste estudo: Raquel Annoni, Larissa Torres, Ana Carolina Durão, Ana Lucia Shimada, Cristina Hebeda, Francine Almeida, Fernanda Lopes, Marisa Dolhnikoff, Milton Martins, Sandra H. P. Farsky, Paulo H. N. Saldiva, Tania Marcourakis, Maria Teresa Trevisan, Thais Mauad. Obrigada pela contribuição de cada um.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

“Mais do que temos... é o que somos...

*Mais do que conquistamos... é o que
ousamos sonhar.*

*A coragem se mede pelo simples ato de
desejar, planejar e então construir.*

*Faça de sua vida algo extraordinário, pois o
homem tem o poder de escrever sua própria
história”*

(Luciana B. C. A.)

NORMAS

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
SUMMARY.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 PARTÍCULAS RESULTANTES DA COMBUSTÃO DO DIESEL (DEP)	2
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO PELAS DEP E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	5
1.3 DIETA E MICRONUTRIENTES.....	11
1.4 O CAJU E SEUS PRINCIPAIS COMPONENTES FENÓLICOS: OS ÁCIDOS ANACÁRDICOS.....	12
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MÉTODOS.....	18
3.1 ANIMAIS.....	19
3.2 ÁCIDOS ANACÁRDICOS	19
3.2.1 <i>Material vegetal</i>	19
3.2.2 <i>Extração e isolamento dos ácidos anacárdicos</i>	20
3.3 ESTUDOS DE TOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DOS ÁCIDOS ANACÁRDICOS	21
3.3.1 <i>Testes de toxicidade aguda, subaguda e mutagenicidade</i>	22
3.3.1.1 Toxicidade Aguda	22
3.3.1.2 Toxicidade Subaguda.....	23
3.3.1.3 Teste de micronúcleo em medula óssea.....	24
3.4 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO ÀS DEP E SUPLEMENTAÇÃO DOS ÁCIDOS ANACÁRDICOS.....	26
3.5 COLETA E PROCESSAMENTO DAS DEP	26
3.6 PROTOCOLO E GRUPOS EXPERIMENTAIS	28
3.7 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS NO TECIDO PULMONAR E NO SANGUE PERIFÉRICO	30
3.7.1 <i>Preparo das amostras</i>	31
3.7.2 <i>Determinação da concentração de proteínas no tecido pulmonar</i>	31
3.7.3 <i>Determinação da atividade de glutathione peroxidase (GPx)</i>	32
3.7.4 <i>Determinação da atividade de glutathione redutase (GR)</i>	32
3.7.5 <i>Determinação da glutathione S-transferase (GST)</i>	33
3.7.6 <i>Determinação da atividade da catalase (CAT)</i>	34
3.8 COLETA E ANÁLISE DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)	34
3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA PULMONAR	36
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1 PESO CORPORAL	40
4.2 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	40
4.3 LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	43
4.3.1 <i>Análise das citocinas no lavado broncoalveolar</i>	43
4.3.2 <i>Perfil celular no lavado broncoalveolar</i>	44
4.4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO PARÊNQUIMA PULMONAR E NOS VASOS PERIBRONQUIOLARES.....	45
4.4.1 <i>Parênquima Pulmonar</i>	45
4.4.2 <i>Vasos peribronquiolares</i>	49
5. DISCUSSÃO.....	51

6. CONCLUSÕES.....	60
7. ANEXO	62
ANEXO - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS E DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (CAPPESQ - HCFMUSP).....	63
8. REFERÊNCIAS	64
Apêndice - Artigo Científico: Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (<i>Anacardium occidentale</i> Linn.) in mice	

LISTA DE ABREVIATURAS

AAs	ácidos anacárdicos
CAT	catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Ctrl	controle
DEP	partículas resultantes da combustão do diesel
DNA	ácido desoxirribonucléico
ed.	edição
EPA	Agência Americana de Proteção Ambiental
et al.	e outros
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
GST	glutathione S-transferase
Hb	hemoglobina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	ácido clorídrico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
ICAM	molécula de adesão intercelular
IL	interleucina
KC	quimiocina correspondente à interleucina 8 em camundongos
LBA	lavado broncoalveolar
LCC	líquido da casca da castanha de caju
NO	óxido nítrico
NF	fator nuclear
OH [•]	radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.	página

PaO ₂	pressão arterial de oxigênio
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PM	material particulado
O ₂ ⁻	ânion superóxido
ONOO ⁻	ânion peroxinitrito
TNF	fator de necrose tumoral
VCAM	molécula de adesão vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos ácidos anacárdicos.....	21
Figura 2. Representação esquemática do protocolo de exposição às partículas resultantes da combustão do diesel (DEP) e suplementação com ácidos anacárdicos (AAs)	29
Figura 3. Atividade das enzimas glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT) no homogenato de pulmão em camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs)..	41
Figura 4. Atividade das enzimas glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT) no sangue periférico em camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs).....	42
Figura 5. Fotomicrografias da densidade de neutrófilos no parênquima pulmonar de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs).....	46
Figura 6. Influxo de neutrófilos e macrófagos no parênquima alveolar de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs)..	47
Figura 7. Representação da área imunomarcada por 8-isoprastano e células positivas expressando KC, TNF- α e NF- κ B no parênquima alveolar de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs).....	48
Figura 8. Gráficos representativos das áreas imunomarcadas por VCAM e KC nos vasos peribronquiolares de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs)..	49
Figura 9. Fotomicrografias representativas do aumento da área imunomarcada por VCAM na camada muscular dos vasos peribronquiolares do grupo diesel em relação ao controle e ao grupo que recebeu 50 mg/Kg de ácidos anacárdicos.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs)..	27
Tabela 2 - Conteúdo de metais nas partículas resultantes da combustão do diesel da frota de ônibus na cidade de São Paulo	28
Tabela 3 - Efeito dos ácidos anacárdicos no ganho de peso corporal de camundongos controles e expostos a instilação intranasal de partículas resultantes do óleo diesel	40
Tabela 4 - Efeito dos ácidos anacárdicos nos níveis de citocinas no sobrenadante do lavado broncoalveolar de camundongos controles e expostos à instilação intranasal de partículas resultantes do óleo diesel.....	43
Tabela 5 - Perfil celular do lavado broncoalveolar de camundongos controles e expostos à instilação intranasal de partículas resultantes do óleo diesel (DEP)	44

RESUMO

Carvalho ALN. *Efeitos dos ácidos anacárdicos no sistema respiratório de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Os ácidos anacárdicos (AAs) provenientes do líquido da casca da castanha de caju têm propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Seus efeitos são bem estabelecidos em vários sistemas *in vitro*, no entanto não há publicações a respeito de suas ações no tecido pulmonar. No presente estudo, foram analisados os efeitos da suplementação dos AAs em modelo de inflamação subaguda induzida pelas partículas resultantes da combustão do diesel (DEP) em camundongos. Camundongos BALB/c machos receberam por 20 dias consecutivos instilação intranasal de 50 µg DEP diluídos em 10 µL de salina. Como pré-tratamento, 10 dias antes do início da instilação intranasal com DEP, os animais foram tratados por via oral com 50, 150 ou 250 mg/kg de AAs diluídos em 100 µL de óleo da castanha de caju ou apenas 100 µL de óleo da castanha de caju (veículo). Foram analisados: a densidade de células inflamatórias, as células imunomarcadas para TNF-α, NF-κB e KC e a área imunomarcada para 8-isoprostano no parênquima pulmonar. Além disso, foi mensurado o perfil celular e de citocinas no LBA e a área imunomarcada por VCAM e KC nos vasos peribronquiolares. As atividades das enzimas antioxidantes GR, GPx, GST e CAT foram analisadas no tecido pulmonar e no sangue periférico. O tratamento com os AAs foram capazes de agir como substâncias protetoras no parênquima pulmonar. A dose de 50 mg/kg demonstrou efeitos mais proeminentes na redução dos marcadores de inflamação pulmonar, no entanto as três doses foram capazes de atuarem como substâncias antioxidantes aumentando a atividade das enzimas antioxidantes e reduzindo a expressão de VCAM nos vasos pulmonares na presença da sobrecarga oxidativa induzida pelas DEP. Portanto, os AAs demonstraram ter potencial preventivo contra os efeitos das DEP no sistema respiratório, atuando como substâncias naturais com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.

Descritores: Ácidos anacárdicos; *Anacardium occidentale*; Antioxidantes; Diesel exaurido; Inflamação pulmonar; Poluição do ar.

SUMMARY

Carvalho ALN. *Effects of the anacardic acids in the respiratory system of mice after intranasal instillation of diesel exhaust particles* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2011.

Anacardic acids (AAs) from cashew nut shell liquid have important antioxidant properties. However despite their well established effects in several systems *in vitro*, there were no reports about their effects in lung tissue. In this present study, we examined the effects of AAs supplementation in a model of low diesel exhaust particles (DEP) induced lung inflammation in mice. Male BALB/c mice received intranasal instillation of 50 µg DEP diluted in 10 µL of saline solution during 20 days. Ten days before instillation, animals were oral treated by the following 30 days with 50, 150 or 250 mg/Kg AAs diluted in 100 µL of cashew nut oil (CNO) or vehicle (100 µL of CNO). In order to evaluate anti-inflammatory and antioxidant effects, we analyzed the influx of inflammatory cells, TNF- α , NF- κ B and KC positive cells; and the expression of 8-isoprostane in alveolar parenchyma. In addition, we measured the cellular profile and cytokines level in BALF and the VCAM and KC expressions in peribronchiolar pulmonary vessels. The activities of antioxidant enzymes GR, GPx, GST and CAT were analyzed by spectrophotometric method to assessing oxidative status in the lung tissue and in the peripheral blood. Treatment with AAs was able to act as a protective substance in lung tissue. The dose of 50 mg/kg showed more prominent effects in decreasing the inflammatory markers caused by DEP, however all the three doses are able to preserve antioxidant enzymes activities in the presence of oxidative charge and decreased the expression of VCAM in vessels. Furthermore, we demonstrated that AAs, which are natural substance, have potential effects against air pollution-related effects in respiratory system, acting as anti-inflammatory and antioxidant properties.

Descriptors: Anacardic acids; *Anacardium occidentale*; Antioxidants; Diesel exhaust particles; Lung inflammation; Air pollution.

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Partículas resultantes da combustão do diesel (DEP)

A poluição do ar tem sido um tema extensivamente pesquisado nas últimas décadas na busca da preservação do meio ambiente e na implementação de um desenvolvimento sustentável, pois seus efeitos afetam de diversas formas a saúde humana (CETESB, 2008). Estudos epidemiológicos têm claramente associado a concentração de material particulado (PM) à uma variedade de efeitos respiratórios e cardiovasculares adversos, aumentando a morbi-mortalidade dessas condições (Pope et al., 2004; Donaldson et al., 2005; Stoeger et al., 2006; Romieu et al., 2008; Wang et al., 2010).

Nas grandes cidades, destaca-se a enorme quantidade de partículas emitidas no ambiente provenientes da exaustão de motores à diesel tais como ônibus, vans e caminhões. Na cidade de São Paulo, a frota veicular de 14.900 ônibus movidos à diesel são responsáveis pela maior parte do transporte público (SPtrans, 2010). Embora, aproximadamente 10% da frota de transporte público na cidade de São Paulo encontram-se em precária condição de manutenção, essa proporção corresponde a 50% das emissões totais de poluentes na atmosfera da cidade (CETESB, 2008).

A combustão completa do diesel produz água e dióxido de carbono. No entanto, o que ocorre na maioria dos veículos é a combustão incompleta que resulta na formação de gases, líquidos e partículas sólidas

intermediárias, incluindo o monóxido de carbono, benzeno, dióxido de enxofre, formaldeídos, hidrocarbonetos, metais de transição e material particulado (Sydbom et al., 2001; Mudway et al., 2004; Riedl e Diaz-Sanchez, 2005). Os motores à diesel emitem 100 vezes mais partículas poluentes que os veículos a gasolina, que possuem modernos sistemas de tratamento, no entanto eles são preferíveis pelo baixo custo do combustível, maior rendimento, eficiência e *endurance* (Riedl e Diaz - Sanchez, 2005).

Os centros urbanos possuem altas concentrações de partículas resultantes da combustão do diesel (DEP) no ar inalado. Nas áreas de trânsito intenso tem-se de $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ a $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$, enquanto que nas cidades menores a concentração é menor que $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Rudell et al., 1999; Bunn et al., 2002; Donaldson et al., 2005). A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) que regulamenta os padrões de qualidade do ar na cidade de São Paulo considera que o limiar aceitável de PM menor de $10 \mu\text{m}$ seja de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$, enquanto a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (CETESB, 2008).

Indivíduos saudáveis expostos ao diesel exaurido podem apresentar sintomas respiratórios agudos, tais como irritação nasal e ocular, dor de cabeça, dispnéia, tosse e fadiga (Rudell et al., 1999; Sydbom et al., 2001). As alterações inflamatórias pulmonares são efeitos decorrentes da exposição ao diesel exaurido bem descritos na literatura. A exposição de voluntários saudáveis às baixas concentrações de diesel, $108 \mu\text{g}/\text{m}^3$, suscitou inflamação neutrofílica nas vias aéreas, sugerindo um movimento das células da parede para o lúmen. A exposição induziu o aumento da

molécula de adesão vascular (VCAM) - 1, da molécula de adesão intercelular (ICAM) - 1, e-selectina e p-selectina. Os autores observaram aumento de 4,1 % na resistência de vias aéreas comparado com indivíduos expostos ao ar ambiental (Stenfors et al., 2004).

A inalação de partículas de diesel em indivíduos saudáveis, com concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, demonstrou alterações inflamatórias no escarro induzido, com aumento do número de neutrófilos, macrófagos, mieloperoxidase e monóxido de carbono exalado, não foram observadas alterações no número de eosinófilos, linfócitos, interleucina (IL) - 8, fator de necrose tumoral (TNF) - α , células epiteliais, função pulmonar e reatividade brônquica à metacolina de voluntários após a exposição (Nightingale et al., 2000).

Quando voluntários saudáveis foram expostos a concentrações maiores de 300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ durante 1 h, houve aumento no lavado broncoalveolar de células inflamatórias como os neutrófilos, linfócitos B, mastócitos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺; e aumento de IL-8 (Takizawa, 2004).

Em camundongos, após 24 horas da instilação intranasal de 15 μg de DEP intranasal observou-se aumento da viscoelasticidade na mecânica pulmonar e recrutamento de células polimorfonucleadas em relação aos controles (Zin et al., 2007).

De acordo com Sydbom et al. (2001), as células inflamatórias, as citocinas, as quimiocinas e a expressão das moléculas de adesão na mucosa da via aérea caracterizam a resposta inflamatória imediata e crônica após a exposição ao diesel exaurido. As concentrações das DEP no ar

desempenham papel importante no curso da resposta inflamatória induzida pela exposição.

1.2 Estresse oxidativo causado pelas DEP e sistema de defesa antioxidante

Os mecanismos pelos quais as DEP promovem efeitos biológicos no sistema respiratório podem ser via efeitos de indução de estresse oxidativo nas células pulmonares expostas (Pandya et al., 2002; Diaz-Sanchez e Riedl, 2005; Romieu et al., 2008). O conceito de estresse oxidativo refere-se ao estado em que a produção de agentes oxidantes ultrapassa as capacidades antioxidantes. Assim, a superprodução de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, tais como o ânion superóxido (O_2^-), o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$) podem culminar em processos de morte celular por necrose ou apoptose, por meio da interação com lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (Maccioni et al., 2001).

Após inalação ou instilação intratraqueal de DEP em camundongos foram observadas produção de O_2^- , H_2O_2 e $OH^\cdot$ (Park et al., 2006). Ainda, estudos confirmam que o estresse oxidativo é um importante regulador da expressão de IL-8, do recrutamento de neutrófilos, de algumas citocinas, como o TNF- α e a IL-6. Há indícios que as partículas de diesel ativam fatores de transcrição, tais como o fator nuclear KB (NF- κ B) e a proteína

ativadora 1, que regulam a expressão de muitas citocinas pró-inflamatórias (Takizawa, 2004; Diaz-Sanchez e Riedl, 2005).

Existe a hipótese, que há dois mecanismos pelos quais os poluentes, como as partículas de diesel exaurido, geram estresse oxidativo nos sistemas biológicos: indiretamente, como resultado de processos inflamatórios pela exposição a poluentes e agentes irritantes que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio em excesso, consequentemente perpetuando a inflamação; e diretamente, pela produção de espécies reativas de oxigênio como ação imediata à exposição (Riedl e Diaz-Sanchez, 2005).

De acordo com o primeiro mecanismo, as células inflamatórias circulantes, quando requisitadas para realização da fagocitose, geram metabólitos de oxigênio (O_2^- , H_2O_2) dentro do fagolisossomo, como consequência do metabolismo oxidativo celular. As espécies não são suficientes para destruição da partícula, então somam-se aos íons cloro e a enzima mieloperoxidase, formando o complexo bactericida mais eficiente dos neutrófilos. No caso das células inflamatórias deficientes em mieloperoxidase, elas liberam outras peroxidases e quantidade adicional de radicais livres, principalmente o radical hidroxila. Assim, os radicais livres formados no meio intracelular são degradados pela defesa antioxidante endógena e as partículas nocivas removidas pelas enzimas hidrolases lisossômicas. No entanto, quando há liberação em excesso desses metabólitos, por um estímulo persistente, as próprias células de defesa

agem como próprio agressor do sistema. A resposta inflamatória exacerba e intensifica o estresse oxidativo (Collins, 2000; Kirkham e Rahman, 2006).

A formação de radicais livres de forma direta ocorre principalmente por meio dos componentes tóxicos das partículas. Elas são altamente reativas, sendo assim o fluxo de elétrons entre uma molécula e outra ocorre de forma rápida e, muitas vezes, irregular, formando os radicais livres em grande quantidade (Kelly, 2003; Donaldson et al., 2005).

As espécies reativas de oxigênio em pequena quantidade podem ser inativadas espontaneamente ou neutralizadas pelos sistemas de defesa antioxidante extracelular ou intracelular. Em excesso, elas podem reagir com a maioria das moléculas do organismo, interferindo nos processos biológicos, sendo responsáveis por diversas doenças, mutações, e envelhecimento (Andrade Jr. et al., 2005).

Segundo Kirkham e Rahman (2006), as espécies reativas em excesso reagem com os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidios das membranas celulares, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares, processo denominado de peroxidação dos lípidos. A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia formando muitos peróxidos lipídicos nocivos. Como consequência, as membranas biológicas perdem sua funcionalidade e estrutura, uma vez que as reações proporcionam além da ruptura das membranas celulares com liberação de organelas, a inativação de receptores e enzimas, o aumento da permeabilidade tissular, as mutações do DNA, o comprometimento da matriz extracelular, proteoglicanos, colágeno e elastina, e formação de resíduos

químicos intracelulares (Gutteridge, 1995; Rahman e Adcock, 2006; Kirkham e Rahman, 2006).

A patogênese de muitas formas de lesão pulmonar tem sido implicada com acúmulo dos produtos finais da peroxidação das membranas celulares, pois as propriedades citotóxicas dessas substâncias estão envolvidas na sinalização de eventos importantes para resposta inflamatória pulmonar (Rahman e Adcock, 2006).

O 8-isoprostano, um isômero da família das prostaglandinas, é produzido *in vivo* primariamente a partir da oxidação do ácido araquidônico nas membranas celulares. Por sua estabilidade química, mecanismo de formação e sensibilidade aos métodos de mensuração, tem sido utilizado como um bom marcador não-invasivo específico de estresse oxidativo *in vivo* (Praticò et al., 2001). Há indícios da participação do 8-isoprostano no estresse oxidativo da fisiopatologia da doença pulmonar obstrutiva crônica, já que os níveis dessa substância na urina foram significativamente maiores comparado a pacientes controles (Andrade Jr. et al., 2005).

Os sistemas de defesa antioxidantes estão em permanente atividade no organismo, necessitando estar presente em quantidades suficientes para neutralização das espécies tóxicas. O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio intracelular e extracelular, varredura dos radicais livres, sequestro dos metais catalizadores da formação de radicais, ou mesmo a interação entre um ou mais mecanismos. A natureza e a composição das defesas variam de tecido

para tecido, bem como entre o ambiente intracelular e extracelular (Kirkham e Rahman, 2006).

No pulmão, a primeira linha de defesa contra os agentes inalantes tóxicos é o fluído que recobre o epitélio das vias aéreas. Diversas substâncias antioxidantes não-enzimáticas são fornecidas principalmente pela dieta, e encontradas em abundância no organismo, como as mucinas, a glutathione reduzida, o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido úrico, o α -tocoferol (vitamina E) e a albumina. Essas substâncias também estão presentes em quantidades variadas no plasma sanguíneo e principalmente nas membranas das células pulmonares. Similarmente, o sistema enzimático constituído pelas enzimas superóxido dismutases, catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) estão presentes no plasma e, principalmente no ambiente intracelular. Ambos os sistemas participam de forma sinérgicas e simultâneas na proteção das estruturas celulares, no ambiente pulmonar. Esses sistemas coexistem no epitélio brônquico, nas células alveolares tipo II, nos macrófagos alveolares, na matriz extracelular, conferindo proteção também para o interstício pulmonar (Kinnula, 2005; Kirkham e Rahman, 2006).

A manutenção da homeostase celular, bem como das suas funções dependem do ambiente de oxi-redução intracelular. A glutathione (GSH) é a enzima antioxidante intracelular, um tripeptídeo de ácido α -glutâmico, cisteína e glicina, utilizada como uma importante medida do estado oxidativo celular, assim como as todas as enzimas associadas ao ciclo de oxi-redução da GSH.

O núcleo do resíduo cistênilglicina da GSH está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz de formar um radical $GS^{\cdot}$, que produz por dimerização a glutathiona oxidada (GSSG). A GPx catalisa esse processo e a GSSG produzida é então reduzida pela glutathiona redutase (GR), regenerando a GSH, num processo dependente de NADPH. A disponibilidade limitada de NADPH pode levar ao aumento de GSSG e deixar as células mais sensíveis ao dano oxidativo (Vannucchi et al., 1998).

A atividade enzimática da GPx é um importante componente na proteção contra radicais livres em espécies que utilizam o metabolismo oxidativo, sendo importante para a sobrevivência da célula por catalisar a redução de H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos (Rover Jr, 2001; Banerjee, 2008).

As enzimas da família da GST são descritas como as mais importantes enzimas envolvidas no processo de metabolismo de compostos eletrofílicos. A GST é uma enzima envolvida no processo de detoxificação celular, mecanismo responsável pela metabolização de xenobióticos (Dourado et al., 2008; Banerjee, 2008).

A CAT é uma hemoproteína que tem especificidade para o peróxido de hidrogênio, não atuando sobre peróxidos orgânicos. Pelo fato de estar compartimentalizada nos peroxissomos e é a mais importante em condições nas quais ocorrem altas concentrações de peróxido de hidrogênio (Vannucchi et al., 1998).

1.3 Dieta e Micronutrientes

Vários estudos se preocupam em identificar substâncias naturais ou sintéticas potenciais que possam otimizar a capacidade antioxidante pulmonar, principalmente contra os efeitos deletérios induzidos pelos poluentes. A dieta é a principal fonte de micronutrientes sendo responsável pela modulação da resposta imune (Elsayed, 2001; Takizawa, 2004; Kelly, 2005; Romieu et al., 2008). Além disso, os antioxidantes regulam as defesas antioxidantes endógenas como as enzimas GR, CAT e também a glutathione na forma reduzida (Mudway et al., 2004).

Recentes estudos demonstram que a suplementação de antioxidantes na dieta (vitaminas C e E, polifenóis, flavonóides, carotenóides) em indivíduos expostos as partículas de diesel pode suprimir a produção de várias citocinas inflamatórias *in vitro* e *in vivo*, além de evitar os danos celulares provocados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio, no entanto o mecanismo de ação dessas substâncias ainda é pouco explorado (Behndig et al., 2006). Os polifenóis são substâncias antioxidantes mais disponíveis na dieta, uma vez que estão presentes na maioria das frutas e plantas. Os benefícios de uma dieta rica em componentes fenólicos estão relacionados principalmente aos seus efeitos como moduladores do estresse oxidativo (Kelly, 2004; Scalbert et al., 2005).

1.4 O caju e seus principais componentes fenólicos: os ácidos anacárdicos

O caju, da espécie *Anacardium occidentale* Linn., é uma planta originária do nordeste do Brasil, sendo cultivada em outras regiões tropicais brasileiras, na Índia e alguns países africanos. O pseudofruto (maçã) e as castanhas são consumidos *in natura* ou convertidas em vários produtos como sucos, chás, geléias, bebidas, conservantes e para estabilização da gasolina demonstrando seu papel importante para fins comerciais nas regiões produtoras (Kubo et al., 1993; Paramashivappa et al., 2001; Trevisan et al., 2006; Narasimhan et al., 2008).

Além disso, esta planta tem sido utilizada na medicina popular para tratamento de processos inflamatórios, doenças gastrointestinais e hipertensão arterial (Mota et al., 1985; Cavalcante et al., 2003; Konan et al., 2007b). Vários estudos avaliaram os efeitos biológicos e o potencial farmacêutico de extratos de caju ou partes da árvore. O pré-tratamento com 200 mg/kg de extrato metanólico da casca do caule do cajueiro promoveu proteção completa contra choque séptico induzido por lipossacarídeo em camundongos Swiss (Olajide et al., 2004). Konan et al. (2007a) demonstraram que o extrato hidroetanólico das folhas do cajueiro, que são ricas em componentes fenólicos inibiram a lesão gástrica induzida por HCl/etanol em ratos.

O pseudofruto (maçã), a castanha (crua ou tostada) e o líquido da casca da castanha de caju (LCC) contem uma variedade de alquéis

fenólicos como os ácidos anacárdicos (AAs), os cardanóis e os cardóis. Grandes quantidades de AAs foram detectados no LCC (353,6 g/kg), seguido do pseudofruto (6,1 g/kg) e da castanha tostada (0,65g/kg) (Trevisan et al., 2006).

Os AAs são uma mistura de ácidos 6-alkil-salicílicos, lipossolúveis, onde os grupos alquílicos variam tanto no comprimento da cadeia lateral como no grau de insaturação das mesmas, sendo mais freqüentes cadeias mono, di ou triinsaturadas. O comprimento das cadeias alquílicas influencia nas atividades biológicas dos ácidos anacárdicos que podem estar relacionadas com o aumento da solubilidade das porções fenólicas nas regiões lipídicas celulares, nas quais é requerida proteção contra degradação biológica ou oxidação química (Correia et al., 2006).

Trevisan et al. (2006) destacaram a capacidade antioxidante dos componentes alquílicos fenólicos do caju (ácidos anacárdicos, cardanols e cardols), principalmente do ácido anacárdico-1 contido no LCC ($IC_{50} = 0,27$ mM) em relação aos outros componentes do caju (cardanol-1 - $IC_{50} > 4$ mM e cardol-1 - $IC_{50} = 1,71$ mM), bem como quando comparado com outros antioxidantes já conhecidos como: hidroxitirosol ($IC_{50} = 1,34$ mM) , tirosol ($IC_{50} = 2,51$ mM), ácido salicílico ($IC_{50} = 4,07$ mM), ácido cafeico ($IC_{50} = 6,05$ mM), trolox ($IC_{50} = 12,24$ mM) no sistema hipoxantina/xantina oxidase. Ainda, os dados demonstraram que os AAs inibiram a geração de superóxido e da xantina oxidase de forma mais eficiente que as outras substâncias antioxidantes estudadas.

Os AAs têm diversas atividades biológicas descritas, incluindo: 1) atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, *Streptococcus mutans* e *Helicobacter pylori* (Muroi e Kubo, 1996; Kubo et al., 1999; Kubo et al., 2003; Green et al., 2007); 2) gastroprotetor (Moraes et al., 2010) e 3) inibidor de várias enzimas pró-oxidantes como a lipooxigenase (Shobha et al., 1994; Ha e Kubo, 2005), a tirosinase (Kubo et al., 1994), a ciclooxigenase (Grazzini et al., 1991; Paramashivappa et al., 2003; Ha e Kubo, 2005) e a histona acetiltransferase (Sun et al., 2006; Dekker e Haisma, 2009). Sung et al. (2008) demonstraram efeito modulador dos ácidos anacárdicos na sinalização do NF-KB a uma variedade de estímulos, sugerindo que os ácidos podem ser opções terapêuticas na prevenção e tratamento do câncer.

Melo et al. (2004) e Trevisan et al. (2006) relatam algumas desvantagens sobre a utilização dos AAs. De acordo com os autores, a indústria limita a quantidade de alquifenóis em formulações de 5 a 10 ppm uma vez que eles podem estar associados às reações alérgicas. Os AAs têm termolabilidade ao calor podendo ocorrer a descarboxilação e assim a formação de cardanol. Como antimicrobiano, podem não ser tão potentes para as aplicações práticas, isso caracteriza um problema da maioria dos fitoquímicos, a melhor estratégia segundo os autores é a combinação de dois ou mais substâncias naturais (Green et al., 2008).

Visto que, muitos micronutrientes antioxidantes são provenientes da alimentação, atenção tem sido dada à qualidade da dieta como estratégia para proteção da população contra os agentes oxidantes ambientais.

No entanto, não foi encontrado na literatura relatos sobre o efeito da ingestão de extratos de caju ou ácidos anacárdicos, disponíveis abundantemente na flora brasileira, em modelos *in vivo* ou *in vitro* expostos à poluição ambiental.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

A partir do exposto, este trabalho pretendeu analisar as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes da suplementação oral com ácidos anacárdicos no modelo de exposição subaguda às partículas resultantes da combustão do diesel em camundongos BALB/c.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar se a suplementação da dieta com os ácidos anacárdicos afeta o desenvolvimento de uma resposta inflamatória pulmonar resultante do modelo de exposição subaguda às partículas resultantes da combustão de diesel.
- ✓ Caracterizar se a exposição a partículas de diesel altera o estado oxidativo de camundongos expostos às DEP da frota de transporte público da cidade de São Paulo comparado aos controles e aos que receberam a suplementação com 50, 150 e/ou 250 mg/kg de ácidos anacárdicos.
- ✓ Correlacionar as possíveis alterações do estado oxidativo pela análise das atividades das enzimas antioxidantes no tecido pulmonar e também a nível sistêmico pela análise do sangue periférico dos camundongos.

3. Métodos

3. Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq - HCFMUSP) sob protocolo nº 0114/07 (Anexo).

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos e fêmeas provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais receberam os cuidados necessários de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório” publicado pela National Institutes of Health (NIH 85-23, revisado em 1985).

3.2 Ácidos anacárdicos

3.2.1 Material vegetal

O caju (*Anacardium occidentale* Linn.) foi coletado na Estação Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, localizada em Paraipaba, Ceará, Brasil, durante a safra de 2007. Os frutos pertenciam ao cultivar comercial (CCP-76), cujo material genético é mantido pelo banco de germoplasma da Embrapa. Os pedúnculos foram separados manualmente das castanhas e enviados aos pesquisadores pelo Dr. Edy Sousa de Brito (Embrapa, Fortaleza, Brasil).

O Líquido da castanha de caju (300 g) foi obtido por aquecimento (175°C) do fruto (1 kg) em estufa por 45 min. O azeite da castanha (2 L) foi obtido através de extração com Soxhlet em hexano (3 horas).

3.2.2 Extração e isolamento dos ácidos anacárdicos

O LCC (200 g) foi dissolvido em solução 5% de água em metanol (1200 mL) onde se acidinou hidróxido de cálcio (100 g) sob agitação. A mistura foi mantida à 50 °C sob agitação por 3 horas. O sobrenadante foi monitorado usando cromatografia em camada delgada para verificar a ausência de AAs. O precipitado anacardato de cálcio foi filtrado e lavado com metanol. O anacardato de cálcio foi então dissolvido em água destilada acidificada 11 M HCl. A solução foi extraída com acetato de etila; a camada de acetato de etila foi lavada com água destilada e seca com sulfato de sódio anidro, e concentrado sob pressão reduzida fornecendo 120 g da mistura dos AAs, como descrito por Paramashivappa et al. (2001). Todas as estruturas foram estabelecidas através da comparação dos dados físicos e espectrais comparados aos relatados na literatura (Trevisan et al., 2006) e também por comparação direta com amostras autênticas. A Figura 1 mostra as estruturas dos AAs isolados do LCC.

Figura 1. Estrutura química dos ácidos anacárdicos.

(a) $C_{22}H_{36}O_3$ (b) $C_{22}H_{34}O_3$ (c) $C_{22}H_{32}O_3$ (d) $C_{22}H_{30}O_3$

3.3 Estudos de toxicidade e mutagenicidade dos ácidos anacárdicos

Não há na literatura trabalhos que avaliam a toxicidade e mutagenicidade dos AAs provenientes do LCC em modelo animal (Sung et al., 2008). Com base nos Guias da Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA, 2002; EPA, 2000), que fornece as regulamentações para normatização de testes com pesticidas e substâncias químicas, foi desenvolvido um protocolo de toxicidade aguda e subaguda dos AAs em camundongos BALB/c de 6 a 8 semanas. Este estudo prévio à utilização dos AAs em camundongos que seriam expostos às partículas resultantes da combustão do diesel se tornou de fundamental importância, uma vez que possibilitou a utilização de doses seguras para realização da pesquisa (Apêndice).

3.3.1 Testes de toxicidade aguda, subaguda e mutagenicidade

3.3.1.1 Toxicidade Aguda

Camundongos BALB/c foram randomizados em três grupos (n=10, com cinco fêmeas e cinco machos em cada grupo de estudo). Os animais receberam por via oral uma única dose de 2000 mg/kg de peso do animal de água (grupo controle); 2000 mg/kg de óleo de castanha (grupo castanha) e 2000 mg/kg de AAs (grupo AAs). Os animais foram acompanhados por 14 dias e observados em relação à alteração de comportamento, sinais e sintomas (avaliação da pele, olhos, efeitos circulatórios e respiratórios, efeitos autonômicos como salivação, efeitos do sistema nervoso central como tremores e convulsões, alterações na postura, força e comportamento estereotipados), peso do animal, quantidade de comida e água ingerida diariamente.

Qualquer animal morto durante o período de 14 dias seria autopsiado, bem como os sobreviventes ao final do protocolo. Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (40 mg/kg) e sacrificados por exsanguinação.

Foi coletado o sangue da artéria axilar dos camundongos para análises bioquímicas (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, uréia e creatinina séricas) e hematológicas (contagem total de leucócitos e eritrócitos, hemoglobina e hematócrito). Os órgãos vitais

(pulmões, coração, fígado, baço e pâncreas) foram removidos, pesados, fixados em formalina 10 % e embebidos em parafina. Cortes histológicos de quatro μm foram corados com hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica. As análises bioquímicas e hematológicas foram realizadas no Laboratório de Hematologia e Análises Clínicas do Departamento de Farmácia da Universidade de São Paulo.

Por meio das análises realizadas, nossos resultados demonstraram não houve morte de nenhum animal e que houveram alterações discretas nos parâmetros após 14 dias da administração da dose de 2000 mg/kg de AAs em relação aos grupos controles, principalmente entre fêmeas. No entanto, essas alterações foram previstas, haja vista a dose elevada administrada. Conclui-se, a partir deste estudo prévio, que a dose letal mínima dos AAs para camundongos adultos BALB/c é superior a 2000 mg/kg.

3.3.1.2 Toxicidade Subaguda

Secundariamente, o teste de toxicidade subaguda foi planejado com objetivo de analisar se doses menores a dose letal (já estabelecida pelo estudo prévio de toxicidade aguda dos AAs) em uso subagudo de 30 dias consecutivos poderiam produzir alterações bioquímicas e hematológicas em camundongos. Sendo assim foram estabelecidas três doses de AAs (300, 600 e 1000 mg/kg) para o estudo subagudo.

Os animais deste estudo (n=10, com cinco fêmeas e cinco machos em cada grupo) receberam por via oral 100 µL de água (grupo controle), 100 µL de óleo de castanha e 300, 600 e 1000 mg/kg de AAs. As doses foram administradas por 30 dias, sendo observados os sintomas e realizados o acompanhamento de peso semanal. As variáveis analisadas foram às mesmas do estudo agudo.

Qualquer animal morto durante o período de 30 dias seria autopsiado, bem como os sobreviventes ao final do protocolo. Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (40 mg/kg) e sacrificados por exsanguinação. Foram realizados os mesmos procedimentos do estudo de toxicidade aguda em relação às variáveis bioquímicas e hematológicas, assim como o processamento do material histológico.

A partir deste estudo de 30 dias de administração diária de doses variadas de AAs, foi demonstrado que não houveram mortes de camundongos e que a administração de 300 mg/kg de AAs foi segura em camundongos BALB/c não produzindo alterações bioquímicas e hematológicas, em machos e em fêmeas.

3.3.1.3 Teste de micronúcleo em medula óssea

Camundongos BALB/c de sete semanas foram randomizados em quatro grupos (n=10, com cinco machos e cinco fêmeas em cada grupo). O grupo teste recebeu dose única de 250 mg/kg de AAs diluídos em 100 µL de óleo da castanha de caju por via oral. O grupo controle positivo recebeu por via intraperitoneal 1mL/100 g de peso corporal de solução de N-metil-N-

nitrosourea (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) diluída em 0,9% de NaCl na concentração de 50 mg/kg. O controle negativo recebeu a dose de 0,9% de NaCl na concentração de 50 mg/kg pela mesma via. O quarto grupo recebeu por via oral 100 µL de óleo da castanha de caju.

O teste do micronúcleo foi conduzido de acordo com o protocolo de MacGregor et al. (1987). Após 24 horas da administração das doses, os animais foram eutanaziados e submetidos à retirada do conteúdo medular do fêmur. O material foi homogeneizado com 3 mL de soro bovino fetal, centrifugado por 5 minutos para a obtenção de uma suspensão homogênea de células em 0,5 mL. Foram preparadas duas lâminas por animal. Após 24 horas de secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas pelo Leishmann (eosina-azul de metileno, MERCK, Darmstadt, Germany). A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados foram obtidas pela análise de 1000 eritrócitos policromáticos por animal. As lâminas foram analisadas de forma codificadas utilizando microscópio ótico com objetiva de 1000 x (imersão de óleo). A identificação dos micronúcleos foi realizada de acordo com critérios adotados por Schmid (1976).

O grupo controle positivo apresentou frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados estatisticamente significativa quando comparado aos animais que receberam a dose de 250 mg/kg de AAs, 100 µL de óleo da castanha de caju e o grupo controle.

Portanto estes estudos prévios de toxicidade aguda, subaguda e mutagenicidade, nos permitem afirmar que doses inferiores há 250 mg/kg

não causaram efeitos adversos nas análises realizadas em camundongos BALB/c e podem ser utilizadas com segurança nestes modelos animais.

3.4 Protocolo de exposição às DEP e suplementação dos ácidos anacárdicos

Após a realização dos estudos de toxicidade e mutagenicidade com os AAs a fim de garantir sua utilização com segurança no modelo animal de camundongos, foi proposto sua utilização em um modelo de poluição causado pela instilação de DEP.

3.5 Coleta e processamento das DEP

As partículas resultantes da combustão do diesel foram coletadas de um ônibus circulante após um dia de rotina de viagens. O ônibus proveniente da frota veicular da cidade de São Paulo era equipado com motor Mercedes Benz® MB 1620, 210-hp com perfil de emissão Euro III, sem controle de injeção eletrônica. Este tipo de ônibus foi escolhido, pois é o meio de transporte público mais freqüente na cidade de São Paulo de acordo com a Prefeitura de São Paulo. O combustível utilizado em São Paulo continha 500 ppm de enxofre e o material particulado resultado da combustão, com partículas de tamanho de aproximadamente 6 a 7 µm foi coletado a partir de um filtro colocado no escapamento do ônibus circulante em fevereiro de 2007. Para este protocolo as DEP foram dissolvidas em salina 10 mg/mL por

2 horas por meio de agitação magnética e sonicadas por 30 min. Então, as DEP foram diluídas para 50 µg em 10 µL de µL de soro fisiológico e armazenada a -20 °C antes da sua utilização.

As características das DEPs da cidade de São Paulo foram avaliadas previamente em relação ao conteúdo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e à sua composição de metais pelos Laboratórios de Poluição Atmosférica da Universidade de São Paulo e pelo Laboratório de Fisiologia Respiratória do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Esses dados foram publicados em 2008 por Laks e colaboradores (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Conteúdo de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs)

PAHs	ng/g
Naftaleno	49,228
Acenaftileno	179,48
Fluoreno	683,937
Pireno	12838,27
B[a]antraceno	1162,73
B[b]fluoranteno	789,9325
B[k]fluoranteno	562,282
B[a]pireno	1642,281
DB[ah]antraceno	94,728

Fonte: Laks et al. (2008)

Tabela 2 - Conteúdo de metais nas partículas resultantes da combustão do diesel da frota de ônibus na cidade de São Paulo

Metais	%
Níquel	0,207
Enxofre	0,920
Ferro	72,954
Vanádio	0,028
Chumbo	0,083
Cádmio	0,035
Cromo	0,149
Cobre	0,116
Outros	25,510

Fonte: Laks et al. (2008)

3.6 Protocolo e grupos experimentais

A inflamação pulmonar foi induzida em camundongos BALB/c machos, com seis a oito semanas de idade, por meio da instilação intranasal de 50 µg de DEP diluídos em 10 µL de soro fisiológico por 20 dias consecutivos. O grupo controle recebeu 10 µL de soro fisiológico pelo mesmo período.

Dez dias antes do início dos procedimentos de instilação intranasal, os animais receberam suplementação oral com 50, 150 ou 250 mg/kg de AAs diluídos em 100 µL de óleo da castanha de caju ou apenas 100 µL de óleo da castanha de caju pelos próximos 30 dias consecutivos. As doses dos AAs foram determinadas de acordo com nossos estudos de toxicidade aguda, subaguda e mutagenicidade prévios, assim como conforme estudos dose-dependentes publicados de espécies co-relatas (Vijayalakshmi et al., 1996; Olajide et al., 2004; Ramprasath et al., 2004; Ramprasath et al., 2006;

Konan et al., 2007a; Konan et al., 2007b; Moraes et al., 2010). A Figura 2 demonstra o esquema do protocolo utilizado neste estudo.

Figura 2. Representação esquemática do protocolo de exposição às partículas resultantes da combustão do diesel (DEP) e suplementação com ácidos anacárdicos (AAs).

Oitenta camundongos foram randomizados em cinco grupos:

Controle (Ctrl): receberam instilação intranasal de 10 µL de soro fisiológico + suplementação oral de 100 µL óleo da castanha;

Diesel (DEP): instilação intranasal de 50 µg de DEP diluídos em 10 µL de soro fisiológico + suplementação oral de 100 µL óleo da castanha;

Grupo Diesel + AAs 50 mg/kg (DA50): instilação intranasal de 50 µg de DEP diluídos em 10 µL de soro fisiológico + suplementação oral de 50 mg/kg de AAs;

Grupo Diesel + AAs 150 mg/kg (DA150): instilação intranasal de 50 µg de DEP diluídos em 10 µL de soro fisiológico + suplementação oral de 150 mg/kg de AAs;

Grupo Diesel + AAs 250 mg/kg (DA250): instilação intranasal de 50 µg de DEP diluídos em 10 µL de soro fisiológico + suplementação oral de 250 mg/kg de AAs.

Para cada grupo experimental, foram utilizados oito animais para coleta do lavado broncoalveolar, análise histológica e imunohistoquímica pulmonar; e oito animais para determinação da atividade das enzimas antioxidantes por meio do homogenato de pulmão. Foi realizada a pesagem dos animais do início e final do protocolo.

3.7 Determinação das atividades enzimáticas no tecido pulmonar e no sangue periférico

Após 24 horas do término da última exposição e suplementação do primeiro grupo de animais, os mesmos foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (40 mg/kg) e sacrificados por deslocamento cervical para retirada do sangue periférico e dos pulmões. As atividades das enzimas GPx, GR, GST e CAT foram determinadas por espectrofotometria em amostras de homogenato do tecido pulmonar e em eritrócitos (Power Wave x 340, Bio-Tek Instruments, software KC4 v 3.0). A atividade de todas as enzimas foram expressas em U/µg de proteína no tecido pulmonar e em U/µg de hemoglobina no sangue.

3.7.1 Preparo das amostras

Para a realização dos ensaios enzimáticos, as amostras de pulmão foram homogeneizadas com sonicator em tampão fosfato pH 7,3 na diluição 1:5. Após dosagem de proteínas as amostras foram aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises.

O sangue, coletado com heparina, foi centrifugado a 700-1000 rpm por 10 minutos a 4°C. O plasma e a camada leucocitária foram desprezados. Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina, uma parte foi congelada a -80°C sem ser lisada para a determinação da concentração de hemoglobina (Hb), e a outra parte foi lisada com a adição de quatro vezes o volume de água Mili Q. Este hemolisado de eritrócitos diluído cinco vezes foi separado em alíquotas e armazenado a -80°C para a realização das análises.

3.7.2 Determinação da concentração de proteínas no tecido pulmonar

A dosagem foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas, e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. A comparação com uma curva padrão de soro albumina bovina fornece a concentração de proteínas presente nas amostras.

3.7.3 Determinação da atividade de glutathione peroxidase (GPx)

Este método baseia-se na medida indireta da atividade da GPx, por meio de uma reação casada com a GR, (Flohé e Günzler, 1984). A glutathione oxidada (GSSG), produzida pela redução por hidroperóxidos pela GPx, é reciclada para gerar seu estado reduzido pela GR e NADPH. O substrato utilizado neste ensaio é o terc-butil hidroperóxido. A oxidação de NADPH a NADP^+ é acompanhada pelo decaimento da absorbância à 340 nm e à 37°C por 5 minutos.

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteínas totais em tecido pulmonar.

3.7.4 Determinação da atividade de glutathione reductase (GR)

O método baseia-se na medida direta da atividade da GR (Carlberg e Mannervik, 1975), que utiliza o NADPH como co-fator na redução da GSSG em GSH. A oxidação de NADPH a NADP^+ é acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm e à 37°C por 10 minutos.

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteína totais em tecido pulmonar (20 a 120 µg) ou o volume de amostra em eritrócitos na diluição 1:200 (30 a 50 µL) mantendo-se os reagentes: NADPH (0,4 mg/mL de meio reacional); glutathione oxidada (2 mg/mL de meio reacional) e EDTA 0,005 mM (30% V/V em meio reacional). Os resultados escolhidos foram aqueles que apresentaram maior linearidade e

atividade enzimática. À microplaca adicionou-se 80 µg de proteínas totais para o pulmão ou 10 µL de eritrócitos (1:20), além de 190 µL de meio reacional, sendo que o meio reacional é composto por 5 mL de tampão fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0,1 M – pH 7,0) com EDTA 1 mM; 3 mL de H_2O Milli-Q; 2 mL de EDTA 0,005 M; 20 mg de GSSG; 4 mg de NADPH. Incubou-se durante 5 minutos à 37°C e a leitura foi realizada em 340 nm e à 37°C durante 20 minutos.

3.7.5 Determinação da glutathione S-transferase (GST)

O método baseia-se na formação de um complexo entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST (Habig et al., 1974). O aumento de absorbância é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra. A formação do complexo foi monitorada por espectrofotometria a 25°C por 5 minutos com absorbância a 340 nm. Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteína totais no pulmão (10 a 100 µg) ou o volume de amostra em eritrócitos na diluição 1:25 (30 a 50 µl), além das soluções reagentes de CDNB 0,1M, preparada em etanol absoluto (5 e 10 µL) e de glutathione reduzida, preparada em tampão fosfato 0,1 M pH=6,5 (10, 15 e 20 µL), além do tempo de incubação na qual se variou entre 2, 5 e 10 minutos.

Assim, as condições ótimas para determinação da atividade enzimática da GST são 80 µg de proteínas totais para o pulmão ou 6,0 µL de eritrócitos (1:25), tampão fosfato 0,1 M pH=6,5 (160 µL); 5µL de solução de

CDNB 0,1 M; essa mistura é pré-incubada por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, adiciona-se 15 μ L de glutathione reduzida (GSH) 0,1M. O aumento na absorbância é monitorado a 340nm por 5 min à 25°C.

3.7.6 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi avaliada por meio do consumo de H_2O_2 , (Aebi, 1984). O decaimento na absorbância é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de amostra (50 a 100 μ L) ou o volume de amostra em eritrócitos na diluição 1:500 (50 a 250 μ L), além das soluções reagentes, volume de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 (300 a 350 μ L), e volume de H_2O_2 0,56% (56,2 μ L de H_2O_2 com qsp 10 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0).

A combinação escolhida que apresentou maior reprodutibilidade, maior atividade e alta linearidade foi a de 50 μ g de proteínas totais para o pulmão ou 100 μ L de eritrócitos (1:25) , 300 μ L de tampão fosfato e 100 μ L de H_2O_2 . A leitura foi realizada por 60 segundos à 240 nm e à temperatura ambiente.

3.8 Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

Após 24 horas do término da última exposição e suplementação (segundo grupo), os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico

(50 mg/Kg por via intraperitoneal), traqueostomizados com cateter intravascular 20G e submetidos à coleta do LBA.

Os pulmões canulados foram massageados e lavados com 1,5 mL (administrados em três volumes de 0,5 mL) de solução salina tamponada com fosfato (PBS). O volume recuperado de aproximadamente 1,2 mL foi centrifugado a 850 rpm, por 10 minutos, à uma temperatura de 05°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -70°C para as análises posteriores das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10. O pellet celular foi ressuspensionado com 300 μ L de PBS e utilizado para avaliação do número total e diferencial de células. Vinte microlitros desta suspensão foram utilizados para a contagem de células totais em um hemacitômetro (Neubauer Improved Chamber, Labor Optik, Friedrichsdorf, Germany). A contagem diferencial das células no LBA a partir de análise microscópica foi realizada com 100 μ L da suspensão na confecção de cada lâmina centrifugada (Cytospin-2, Shandon Instruments, Sewickley, PA). As lâminas foram fixadas com metanol, e coradas com Diff Quik (Muto Kagaku Co., Tokyo, Japan); 300 células foram analisadas nas lâminas.

A quantificação dos níveis de citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 foram realizadas utilizando método imuno-enzimático (ELISA) de acordo com o protocolo do fabricante. Os kits para IL-1 β foram obtidos da eBioscience (San Diego, CA, USA) e os kits para TNF- α , IL-6 e IL-10 foram comprados da BD Biosciences (Sparks, MD, USA).

3.9 Análise histológica, imunohistoquímica e morfométrica pulmonar

Após a coleta do lavado broncoalveolar, os pulmões foram retirados e fixados em formalina 4% e embebidos em parafina conforme rotina do Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Cortes de cinco μm foram utilizados para marcação com HE para análise histológica de rotina do material e determinação da densidade numérica de neutrófilos.

A determinação da densidade numérica de neutrófilos no parênquima pulmonar foi realizada por morfometria convencional, utilizando-se um retículo de 100 pontos (com área de $7000 \mu\text{m}^2$ no aumento de 1000x) acoplado à ocular do microscópio. Determinamos a densidade numérica de neutrófilos a partir do número de células que incidiam sobre o campo de análise corrigido pelo número de pontos que incidiam no parênquima pulmonar (área de tecido pulmonar). Foram analisados 40 campos de parênquima pulmonar para cada animal no aumento de 1000 x. O resultado foi expresso como células/ mm^2 de tecido (Lanças et al., 2006).

A análise imunohistoquímica foi realizada para determinação da imunomarcação da expressão da densidade numérica de macrófagos, da quimiocina correspondente à IL-8 em camundongos (KC), VCAM-1, TNF- α , NF- κB e 8-isoprostano. Os cortes foram desparafinizados e uma solução de peróxido de hidrogênio foi aplicada por 35 minutos. A recuperação do antígeno foi realizada com solução citrato (pH=6,0), tris-EDTA ou tripsina. Os cortes foram incubados com anticorpos primários overnight a 4°C. Os

seguintes anticorpos primários foram utilizados: goat 8-epi-PGF_{2α} (goat, 1:500, Oxford Biomedical Research, Oxford, England); mouse Mac-2 (mouse, 1:100,000, Cedarlane, ON, Canada); goat TNF-α (goat, 1:2,000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); rabbit VCAM-1 (rabbit, 1:600, Santa Cruz Biotechnology); rabbit NFκB p65 (rabbit, 1:200, Santa Cruz Biotechnology,); mouse CXCL1/KC (mouse, 1:100, Cedarlane, MN, USA). O kit Vectastin ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) foi utilizado como anticorpo secundário e, como cromógeno foi utilizado o 3,3 diaminobenzidina (DAB), (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris. Para os controles negativos o BSA foi utilizado ao invés do primeiro anticorpo.

A expressão de diversas proteínas imunomarcadas foram quantificadas no parênquima pulmonar e/ou em vasos peribronquiolares utilizando um software Image-Pro Plus 4.1 para Windows (Media Cybernetic, Silver Spring, Md) adaptado a um computador e conectado a uma câmera digital (Olympus Q-color 5, Tokyo, Japan) e um microscópio eletrônico (Leica, DMR, Germany). As áreas imunomarcadas pelo 8-isoprostano, KC, TNF-α, NF-κB e a densidade numérica de macrófagos foram determinadas no parênquima pulmonar. Foi realizada a contagem do número de células imunomarcadas no parênquima pulmonar pela área total de tecido em cada campo. As análises foram calculadas em 20 campos no aumento de 200x. Os resultados foram expressos em área imunomarcada de 8-isoprostano por área de tecido ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$), em células positivas para imunomarcção com KC, TNF-α, NF-κB por área de tecido pulmonar (células/ μm^2) e em

densidade numérica de macrófagos por área de tecido (células/mm²). As áreas imunomarcadas com VCAM-1 e KC foram determinadas em cinco vasos peribronquiolares por animal no aumento de 200 x, sendo que os resultados foram expressos em área imunomarcada pelo perímetro externo da camada muscular do vaso ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). Todas as análises foram conduzidas pelo mesmo observador, sendo que as lâminas foram codificadas para análise cega.

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio da utilização do programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL, USA). Os valores foram expressos em média e desvio padrão (dados paramétricos) ou mediana e intervalo interquartil (dados não paramétricos). Para avaliação da normalidade dos dados foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnov. Foram utilizadas as seguintes comparações: grupo controle (Ctrl) x grupo diesel (DEP); grupo diesel (DEP) x demais grupos expostos ao DEP com tratamento dos ácidos anacárdicos nas três doses (DA50, DA150, DA250). Utilizamos o teste t *Student* não-pareado ou *Mann-Whitney*. O valor de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ para todas as análises.

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Peso corporal

Todos os animais do estudo obtiveram ganho de peso corporal (Tabela 3), no entanto os animais do grupo DEP obtiveram ganho de peso menor em relação ao grupo Ctrl ($p<0,01$); ao grupo DA50 e ao grupo DA250 ($p<0,05$).

Tabela 3 - Efeito dos ácidos anacárdicos no ganho de peso corporal de camundongos controles e expostos a instilação intranasal de partículas resultantes do óleo diesel

	Ctrl	DEP	DA50	DA150	DA250
Ganho de Peso (g)	3,88±0,58	2,53±0,48 [#]	3,67±1,01 [*]	2,23±1,25	3,47±0,81 [*]

Valores expressos em média ± desvio padrão. Ctrl=controle (100 µL óleo de castanha de caju + instilação intranasal 10µL de soro fisiológico). Diesel=100 µL óleo de castanha de caju+ instilação intranasal 50 µg DEP. DA50=50 mg/Kg de ácidos anacárdicos + instilação intranasal 50 µg DEP. DA150=150 mg/Kg de ácidos anacárdicos + instilação intranasal 50 µg DEP. DA250=250 mg/Kg de ácidos anacárdicos + instilação intranasal 50 µg DEP. [#] $p<0,001$ estatisticamente significativa em relação ao grupo Ctrl. ^{*} $p<0,05$ estatisticamente significativa em relação ao grupo DEP.

4.2 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas GR, GPx, GST e CAT demonstrou o mesmo padrão em todos os grupos (Figura 3). O grupo DEP apresentou diminuição da atividade de todas as enzimas em relação ao grupo controle ($p<0,05$), sendo mais evidente para as atividades da GST e CAT ($p<0,001$). Os três grupos que receberam a suplementação com AAs nas doses de 50, 150 e 250 mg/kg demonstraram aumento estatisticamente significativo das

atividades de todas as enzimas quando comparadas ao grupo DEP ($p<0,05$), sendo que este aumento foi mais relevante para as atividades da GST e CAT ($p<0,001$). No sangue periférico (Figura 4), o grupo DEP apresentou aumento da atividade da GR em relação ao controle ($p<0,05$).

Figura 3. Atividade das enzimas glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), glutatona S-transferase (GST) e catalase (CAT) no homogenato de pulmão em camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs). Valores estão representados em média $\pm$ EPM. Ctrl= instilação intranasal de 10 μ L de salina e suplementação oral com 100 μ L de óleo da casca da castanha de caju. DEP= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 100 μ L de óleo da casca da castanha de caju. DA50= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 50 mg/kg de AAs. DA150= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 150 mg/kg de AAs. DA250= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 250 mg/kg de AAs. # $p<0,05$ comparado ao Ctrl. ## $p<0,001$ comparado ao Ctrl. * $p<0,05$ em relação ao grupo DEP. ** $p<0,001$ em relação ao grupo DEP.

Figura 4. Atividade das enzimas glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), glutatona S-tranferase (GST) e catalase (CAT) no sangue periférico em camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs). Valores estão representados em média $\pm$ EPM. Ctrl= instilação intranasal de 10 μ L de salina e suplementação oral com 100 μ L de óleo da casca da castanha de caju. DEP= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 100 μ L de óleo da casca da castanha de caju. DA50= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 50 mg/kg de AAs. DA150= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 150 mg/kg de AAs. DA250= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 250 mg/kg de AAs. [#] $p < 0,05$ comparado ao Ctrl.

4.3 Lavado Broncoalveolar

4.3.1 Análise das citocinas no lavado broncoalveolar

A tabela 4 demonstra o aumento estatisticamente significativo nos níveis de TNF- α no sobrenadante do LBA no grupo DEP comparado com grupo Ctrl ($p<0,001$). Quando comparado o grupo DEP com o grupo DA50 houve diminuição estatisticamente significativa nos valores desta citocina ($p<0,05$). As IL-6 e IL-10 não apresentaram diferença estatística nas comparações realizadas, porém em relação a IL-1 β houve aumento nos grupos DA150 e DA250 em relação ao grupo DEP ($p<0,05$).

Tabela 4 - Efeito dos ácidos anacárdicos nos níveis de citocinas no sobrenadante do lavado broncoalveolar de camundongos controles e expostos à instilação intranasal de partículas resultantes do óleo diesel

Citocina	Ctrl	DEP	DA50	DA150	DA250
(pg/mL)					
IL-1 β	189,40 $\pm$ 43,56	228,52 $\pm$ 66,25	181,51 $\pm$ 66,30	451,45 $\pm$ 138,14*	459,72 $\pm$ 175,81*
TNF- α	19,84 $\pm$ 10,87	118,86 $\pm$ 54,24 [#]	25,83 $\pm$ 6,42*	112,44 $\pm$ 37,73	130,83 $\pm$ 64,67
IL-6	61,96 $\pm$ 40,73	74,84 $\pm$ 42,84	62,58 $\pm$ 46,53	118,11 $\pm$ 77,08	103,04 $\pm$ 51,44
IL-10	1126,36 $\pm$ 463,89	1526,35 $\pm$ 538,16	1362,49 $\pm$ 217,83	1862,99 $\pm$ 646,02	1508,36 $\pm$ 499,59

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Ctrl=controle (100 μ L óleo de castanha de caju + instilação intranasal 10 μ L de soro fisiológico). DEP=100 μ L óleo de castanha de caju+ instilação intranasal 50 μ g DEP. DA50=50 mg/Kg de ácidos anacárdicos + instilação intranasal 50 μ g DEP. DA150=150 mg/Kg de ácidos anacárdicos + instilação intranasal 50 μ g DEP. DA250=250 mg/Kg de ácidos anacárdicos + instilação intranasal 50 μ g DEP. [#] $p<0,001$ estatisticamente significativo em relação ao grupo Ctrl. * $p<0,05$ estatisticamente significativo em relação ao grupo DEP.

4.3.2 Perfil celular no lavado broncoalveolar

Não houve diferença estatisticamente significativa do grupo Ctrl em relação ao grupo DEP na quantidade dos diversos tipos de células presentes no lavado broncoalveolar (tabela 5). Houve aumento estatisticamente significativo no número de linfócitos no grupo DA150 e no número de neutrófilos no grupo DA250 em relação ao grupo DEP ($p < 0.05$).

Tabela 5 - Perfil celular do lavado broncoalveolar de camundongos controles e expostos à instilação intranasal de partículas resultantes do óleo diesel (DEP)

Perfil Celular	Ctrl	DEP	DA50	DA150	DA250
(x10 ⁴)					
Células Totais	5,88±2,61	6,76±2,05	8,10±1,61	8,74±1,42	7,52±0,99
Eosinófilos	0,00(0,00)	0,00(0,06)	0,00(0,02)	0,00(0,19)	0,00(0,00)
Neutrófilos	0,04(0,24)	0,12(0,13)	0,21(0,36)	0,20(0,31)	0,23(0,10)*
Linfócitos	0,63±0,42	0,47±0,71	0,99±0,56	1,33±0,64*	1,17±0,80
Macrófagos	4,38±2,24	5,36±1,77	5,86±1,06	6,33±1,32	5,37±0,73
Caliciformes	0,41±0,26	0,47±0,41	0,57±0,36	0,19±0,19	0,24±0,19
Ciliares	0,31±0,27	0,26±0,17	0,41±0,20	0,54±0,47	0,44±0,27

Valores expressos em média ± desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil. Ctrl=controle (100 µL óleo de castanha de caju + instilação intranasal 10µL de soro fisiológico). DEP=100 µL óleo de castanha de caju+ instilação intranasal 50 µg DEP. DA50=50 mg/Kg de ácidos anacárdicos + instilação intranasal 50 µg DEP. DA150=150 mg/Kg de ácidos anacárdicos + instilação intranasal 50 µg DEP. DA250=250 mg/Kg de ácidos anacárdicos + instilação intranasal 50 µg DEP. * $p < 0,05$ estatisticamente significativa em relação ao grupo DEP.

4.4 Resposta inflamatória no parênquima pulmonar e nos vasos peribronquiolares

4.4.1 Parênquima Pulmonar

Na análise da densidade do número de neutrófilos no parênquima pulmonar (Figura 5), houve aumento significativo no influxo de células do grupo DEP em relação ao grupo Ctrl ($p<0,001$). Os grupos que receberam tratamento com os ácidos anacárdicos 50 e 150 mg/Kg (DA50 e DA150) apresentaram diminuição no número de neutrófilos em relação ao grupo DEP ($p<0,001$). Não houve diferença estatisticamente significante na densidade de células imunomarcadas para macrófagos no parênquima alveolar entre os grupos DEP e Ctrl. No entanto nos grupos DA50 e DA150 ocorreu diminuição do influxo de células em relação ao DEP ($p<0,05$). A figura 6 demonstra os gráficos representativos do influxo das células inflamatórias no parênquima pulmonar.

Figura 5. Fotomicrografias da densidade de neutrófilos no parênquima pulmonar de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs). No grupo diesel (B) é possível visualizar o aumento do influxo de células neutrofílicas comparado ao grupo controle (A) e aos grupos que receberam 50 (C) e 150 (D) mg/kg de AAs. No detalhe, é possível visualizar as partículas resultantes da combustão do diesel (pigmentos antracóticos) fagocitadas pelo macrófago no parênquima pulmonar. Escala= 25 μ m (1000 x - HE).

Figura 6. Influxo de neutrófilos (A) e macrófagos (B) no parênquima alveolar de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs). Valores estão representados em média $\pm$ EPM. Ctrl= instilação intranasal de 10 μ L de salina e suplementação oral com 100 μ L de óleo da casca da castanha de caju. DEP= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 100 μ L de óleo da casca da castanha de caju. DA50= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 50 mg/kg de AAs. DA150= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 150 mg/kg de AAs. DA250= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 250 mg/kg de AAs. [#] $p < 0,001$ comparado ao Ctrl. ^{*} $p < 0,05$ em relação ao grupo DEP.

Não houve diferença estatisticamente significativa na área de parênquima alveolar imunomarcada pelo 8-isoprostano entre os grupos DEP e Ctrl, embora o grupo que recebeu 250 mg/kg de AAs apresentou valores elevados comparado ao grupo DEP ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa nas células expressando TNF- α e NF- κ B no tecido pulmonar dos grupos estudados. Em relação às células imunomarcadas para KC, não foi observada diferença estatística no grupo DEP comparado ao Ctrl, no entanto os grupos DA50 e DA250 apresentaram diminuição da expressão de células para KC em relação ao grupo DEP ($p < 0,001$ e $p < 0,05$; respectivamente). Esses dados estão apresentados na figura 7.

Figura 7. Representação da área imunomarcada por 8-isoprostano (A) e células positivas expressando KC (B), TNF- α (C) e NF- κ B (D) no parênquima alveolar de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs). Valores estão representados em média $\pm$ EPM ou mediana e intervalo interquartil. Ctrl= instilação intranasal de 10 μ L de salina e suplementação oral com 100 μ L de óleo da casca da castanha de caju. DEP= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 100 μ L de óleo da casca da castanha de caju. DA50= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 50 mg/kg de AAs. DA150= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 150 mg/kg de AAs. DA250= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 250 mg/kg de AAs. * p <0,05 em relação ao grupo DEP.

4.4.2 Vasos peribronquiolares

Em relação à análise de marcadores inflamatórios nos vasos peribronquiolares (Figura 8), houve um aumento estatisticamente significativo da área imunomarcada por VCAM no grupo DEP comparado ao Ctrl ($p<0,05$). Os animais que receberam qualquer uma das três doses de ácidos anacárdicos apresentaram diminuição nos valores em relação do grupo DEP ($p<0,05$), (Figura 9). Na análise das áreas imunomarcadas por KC na camada muscular dos vasos, não houve diferença estatística entre os grupos DEP e Ctrl, contudo observou-se diminuição nos valores de KC dos grupos DA50 e DA150 comparados ao grupo DEP ($p<0,001$ e $p<0,05$; respectivamente).

Figura 8. Gráficos representativos das áreas imunomarcadas por VCAM (A) e KC (B) nos vasos peribronquiolares de camundongos submetidos à instilação intranasal de partículas resultantes da combustão de diesel e suplementados com os ácidos anacárdicos (AAs). Valores estão representados em média $\pm$ EPM. Ctrl= instilação intranasal de 10 μ L de salina e suplementação oral com 100 μ L de óleo da casca da castanha de caju. DEP= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 100 μ L de óleo da casca da castanha de caju. DA50= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 50 mg/kg de AAs. DA150= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 150 mg/kg de AAs. DA250= instilação intranasal de 50 μ g de partículas resultantes da combustão do diesel diluídos em 10 μ L de salina e suplementação oral com 250 mg/kg de AAs. # $p<0,05$ em relação ao grupo Ctrl. * $p<0,05$ em relação ao grupo DEP. ** $p<0,001$ em relação ao grupo DEP.

Figura 9. Fotomicrografias representativas do aumento da área imunomarcada por VCAM na camada muscular dos vasos peribronquiolares do grupo diesel (B) em relação ao controle (A) e ao grupo que recebeu 50 mg/Kg de ácidos anacárdicos (C). Escala= 25 μ m (200 x).

5. Discussão

5. Discussão

No presente estudo foi demonstrado que a suplementação oral dos AAs associaram-se a uma resposta anti-inflamatória e antioxidante no tecido pulmonar de camundongos expostos as DEP. A suplementação oral por 30 dias de AAs com 50, 150 e 250 mg/kg preveniram a depleção das enzimas antioxidantes GR, GPx, GST e CAT no tecido pulmonar. Além disso, todas as doses testadas diminuíram a expressão de VCAM nos vasos peribronquiolares neste modelo de inflamação causado pela exposição subaguda às partículas de DEP. Não foi observado, após 24 horas o mesmo efeito protetor das enzimas antioxidantes à nível sistêmico. Os animais que receberam 50 mg/kg de AAs demonstraram decréscimo da densidade de neutrófilos e TNF- α no parênquima pulmonar e no sobrenadante do LBA, respectivamente. Nosso estudo é o primeiro encontrado na literatura que propõe o uso *in vivo* dos AAs e demonstra suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes no tecido pulmonar.

Os animais expostos aos DEP obtiveram menor ganho de peso corporal quando comparados aos outros grupos. Nossos achados vão de encontro à literatura que cita, que animais expostos à poluição ambiental têm redução no ganho de peso ao longo da exposição. Similarmente, animais expostos por 13 dias e por 45 dias à fumaça de cigarro apresentaram menor ganho de peso em comparação aos animais controles (Torres et al., 2009).

O modelo de inflamação de exposição aos baixos níveis de DEP (50 μ g) foi caracterizado pela presença de marcadores inflamatórios no

parênquima pulmonar, LBA, vasos peribronquiolares e pela atividade reduzida das enzimas antioxidantes estudadas. Este modelo murino de exposição proposto neste estudo é relevante, pois reflete a condição real do cenário urbano da megacidade de São Paulo, onde a concentração média de PM menor que 10 μm é aproximadamente 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, considerando que o limiar aceitável pela CETESB é de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (CETESB, 2008) e pela OMS é de 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Durante o inverno níveis acima de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ são frequentemente observados em São Paulo (CETESB, 2008; Yoshizaki et al., 2010).

Yoshizaki et al. (2010) demonstraram que a instilação intranasal de baixas doses de DEP (30 μg) provenientes da frota veicular de São Paulo já provocou após 30 dias aumento no número de células totais no LBA, após 60 dias de exposição ao DEP, os efeitos foram ainda mais proeminentes com aumento no número de células totais no LBA, aumento da expressão gênica MUC5ac e, espessura e conteúdo de muco ácido no epitélio nasal.

O aumento provável da sobrecarga oxidativa causada pelas DEP neste trabalho é refletido pelos marcadores de resposta inflamatória e oxidativa. Os resultados em relação aos efeitos dos AAs no tecido pulmonar nos fornecem informações importantes a respeito das enzimas do ciclo de oxi-redução da glutatona, uma vez que todos os animais tratados com as três doses de AAs apresentaram elevação da atividade enzimática da GR, GPx, GST e CAT semelhantes aos valores do controle sugerindo que os AAs parecem agir como substâncias importantes na manutenção da defesa antioxidante.

O sistema de redox da GSH é o sistema de defesa antioxidante mais importante das células pulmonares, responsáveis pela primeira linha de defesa contra agentes externos (Ballatori et al., 2009). Acredita-se que a quantidade de glutathione e de enzimas associadas à glutathione presentes no trato respiratório inferior seja responsável pela primeira linha de defesa contra agentes externos. Desafios oxidativos sustentados causam depleção da glutathione pulmonar, bem como de outros antioxidantes (Deleve e Kaplowitz, 1990; Pacht et al., 1991, Kinnula et al., 1992, Kinnula, 2005; Biswas e Rahman, 2009).

Variações nos níveis de GSH reduzida afetam diretamente a ação de detoxicação e neutralização realizada pelas enzimas GPx e GST, já que elas utilizam a GSH reduzida como substrato na detoxicação de peróxidos e peróxidos lipídicos (Ballatori et al., 2009), além da metabolização de xenobióticos (Dourado et al., 2008; Banerjee, 2008), respectivamente.

Nosso estudo está de acordo com outros que sugerem diminuição dos níveis de GSH no fluído que recobre o epitélio das vias aéreas em doenças inflamatórias do sistema respiratório e exposição aos agentes inalatórios tóxicos, assim como em doenças como a fibrose cística idiopática, síndrome do desconforto respiratório agudo e pacientes HIV positivos (Rahman et al., 1999, Rahman e Macnee, 2000). Observou-se também elevação da atividade da CAT, que é uma enzima com especificidade pelo H_2O_2 , nos grupos que receberam tratamento com AAs, sugerindo aumento da detoxicação local de peróxido de hidrogênio no tecido pulmonar.

Ao analisar e comparar o comportamento sistêmico (sangue periférico) e pulmonar (tecido pulmonar) dos ácidos anacárdicos em relação às enzimas antioxidantes GR, GPx, GST e CAT, observamos que os efeitos protetores dos ácidos ocorrem no tecido pulmonar, porém o mesmo efeito não é visualizado à nível sistêmico. Acreditamos que, provavelmente, houve uma alteração inflamatória e oxidativa provocada pelo DEP, que após 24 horas do sacrifício as enzimas antioxidantes GPx, GST e CAT retornaram aos valores basais no sangue, contudo a GR permaneceu elevada no grupo DEP, sugerindo que não foi possível estabilizar os níveis de GSH, uma vez que a GR é responsável pela reposição dos níveis de GSH no sangue. Podemos concluir que o sistema antioxidante do sangue foi eficiente e, provavelmente está se adaptando após 24 horas de exposição ao diesel.

Outra hipótese seria que o modelo proposto de exposição ao DEP pode ter causado apenas efeitos oxidativos locais que não foram refletidos sistemicamente; uma explicação pode ser atribuída a (pressão arterial de oxigênio) PaO_2 local (alveolar/pulmonar) que é maior que a PaO_2 da circulação sistêmica o que predispõe relações de oxido-redução maiores a nível pulmonar. A GR com atividade aumentada no sangue no grupo DEP após 24 horas, pode refletir uma resposta inicial aos eventos oxidativos pulmonares.

De acordo com Kubo et al. (2006) e Correia et al. (2006) os AAs não estão envolvidos diretamente na síntese da glutathiona, mas eles podem agir com antioxidantes preventivos e substâncias de quebra da cadeia oxidativa.

A atividade antioxidante dos AAs pode ser atribuída à capacidade de supressão de uma variedade de enzimas pró-oxidativas envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio (Ha e Kubo, 2005; Sun et al., 2006); agindo diretamente na quelação de íons metálicos (Kubo et al., 2006; Tsujimoto et al, 2007) e prevenindo a geração de ânion superóxido (Masuoka e Kubo, 2004; Kubo et al., 2006; Trevisan et al, 2006). Kubo et al (2006) demonstraram que uma concentração de 30 $\mu\text{L/mL}$ de AAs foi capaz de inibir em 82% da formação de ânion superóxido utilizando um ensaio com a enzima xantina oxidase. Os possíveis mecanismos para esses efeitos bem estabelecidos dos AAs estão relacionados à cadeia lateral de 15 carbonos e ao grau de insaturação ligados ao anel de benzeno na sua estrutura química que estão intimamente relacionados aos efeitos dos AAs na estrutura e na atividade das enzimas nas células.

Diante do exposto, acreditamos que os AAs contribuem para melhora do estado oxidativo das células no tecido pulmonar facilitando, então a recuperação dos níveis de GSH assim como de outros possíveis antioxidantes.

Em relação à variedade de marcadores anti-inflamatórios estudados, os animais que receberam a menor dose de AAs (50 mg/kg) obtiveram resultados mais consistentes no decréscimo dos marcadores de inflamação pulmonar causados pelo DEP em comparação com as outras doses propostas. A maior dose utilizada (250 mg/kg) demonstrou não prevenir a inflamação induzida por DEP. Além disso, esta dose foi associada ao

aumento da expressão de 8-isoprostano e KC no parênquima pulmonar; aumento de IL-1 β e influxo de neutrófilos no LBA; quando comparado ao grupo DEP. Respostas contraditórias foram encontradas nos animais que receberam a dose intermediária de 150 mg/kg de AAs. Houve diminuição na densidade de neutrófilos e macrófagos no parênquima pulmonar, redução da imunomarcção de VCAM e KC nos vasos, no entanto foram encontrados valores elevados de IL-1 β e linfócitos no LBA quando esses parâmetros foram comparados ao grupo DEP.

Entendemos, diante do exposto que provavelmente a dose de 150 mg/kg seja a dose mais próxima ao ponto de corte em uma curva dose-resposta para efeitos do AAs no pulmão, considerando nossos resultados talvez a melhor dose que promove as melhores respostas anti-inflamatórias e antioxidantes para o modelo de poluição por DEP esteja entre 50 e 150 mg/kg. Estudo semelhante de Moraes et al. (2010) descreveram efeitos gastroprotetores de AAs relacionados à um padrão dose-resposta, ou seja, animais que receberam 10, 30 e 100 mg/kg obtiveram redução de lesão gástrica induzida por etanol, sendo que a dose de 30 mg/kg foi capaz de inibir a depleção de GSH, CAT, superóxido dismutase e nitrito/nitrato, refletindo o potencial antioxidante da substância nesta dose considerando este modelo.

Não há publicações sobre os efeitos dos AAs como moduladores de inflamação pulmonar. Sung et al. (2008) verificaram que os AAs inibiram o NF-kB via ativação de TNF- α em células H1299 de adenocarcinoma

pulmonar em humanos, demonstrando o potencial quimioterapêutico dos AAs no câncer de pulmão.

Em nosso estudo, os AAs não obtiveram alterações na densidade de células imunomarcadas para TNF- α e NF-kB no parênquima pulmonar. É possível que este modelo de exposição subaguda a baixas quantidades de DEP não seja apropriado para estudo desses mecanismos. Tem sido proposto um modelo hierárquico de estresse oxidativo que pode explicar as respostas dose - dependentes à exposição de poluentes no ar (Romieu et al., 2008). Os autores descreveram que baixa exposição aos poluentes pode promover a formação de radicais livres ativando uma resposta antioxidante e apenas nas altas exposições aos poluentes ocorre uma resposta em relação à transcrição de NF-kB e proteína de ativação-1 elevando a expressão de citocinas pró-inflamatórias pulmonares (Romieu et al., 2008).

O presente estudo apresenta algumas limitações importantes. Considerando que foram realizados testes de toxicidade aguda, subaguda e mutagenicidade prévios para determinação das doses a serem utilizadas neste experimento e garantir a segurança do uso de AAs *in vivo*, contudo não foram determinadas as rotas de absorção e metabolismo da droga em camundongos e; não há informações sobre estudos em relação à isso em humanos. Foram relatadas algumas hipóteses, como: os AAs podem ser absorvidos por meio do trato gastrointestinal e entregue nos locais onde as defesas antioxidantes são necessárias; podem ser absorvidos como formas inativas ou excretados e não absorvidos nos sistemas (Trevisan et al., 2006;

Kubo et al., 2006; Sung et al., 2008). Além disso, investigamos apenas o mecanismo parcial de ação dos AAs *via* modulação do estresse oxidativo por meio das enzimas antioxidantes e conseqüentemente da inflamação pulmonar e não todos os outros possíveis mecanismos pelos quais os AAs podem influenciar às respostas no parênquima pulmonar contra poluição induzida pelo DEP. Sugere-se estudos para determinação da relação GSH/GSSG e o envolvimento de aldeídos oriundos da peroxidação lipídica, como o teste para verificação dos ácidos tiobarbitúricos reagentes, malondialdeídos ou 4-hidroxi-2-nonenal para podermos ter uma análise mais completa das variações redox no tecido pulmonar induzidas por DEP e possivelmente remediadas pelos ácidos anacárdicos.

Portanto, os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes dos AAs neste estudo de inflamação pulmonar induzida por DEP podem ser associados, provavelmente, a melhora do estado oxidativo pulmonar que ocorre em conseqüência da prevenção da geração de espécies reativas de oxigênio ou pela recuperação das defesas antioxidantes no sistema respiratório.

O Brasil é conhecido por sua megadiversidade com grande potencial para desenvolvimento de novas terapêuticas derivadas da flora nativa. O caju (*Anacardium occidentale* Linn.) apresenta uma série de propriedades biológicas e constituintes, como os ácidos anacárdicos, capazes de atuarem em vários sistemas por diversos mecanismos. Desta forma, nosso estudo contribui para o melhor conhecimento biológico de potenciais substâncias terapêuticas encontradas abundantemente na flora brasileira.

6. Conclusões

6. Conclusões

- ✓ A suplementação oral com os AAs apresentou potencial antioxidante e anti-inflamatório no modelo de exposição subaguda de DEP em camundongos BALB/c.
- ✓ Os ácidos apresentaram efeito protetor na resposta inflamatória pulmonar, principalmente reduzindo a expressão de VCAM, densidade de neutrófilos e TNF- α no parênquima e LBA, respectivamente. A dose de 50 mg/kg de AAs apresentou efeitos mais benéficos na redução da inflamação pulmonar.
- ✓ Todas as três doses de AAs demonstraram proporcionar aumento das atividades das enzimas antioxidantes GR, GPx, GST e CAT no pulmão após sobrecarga oxidativa induzida por DEP sugerindo efeito protetor dos ácidos anacárdicos. A nível sistêmico, os ácidos não obtiveram o mesmo comportamento após 24 horas do sacrifício, sugerindo que as respostas pulmonares e sistêmicas à ação dos ácidos anacárdicos podem ser diferenciadas.
- ✓ Os AAs são substâncias potenciais na modulação das respostas inflamatórias e oxidativas pulmonares. Consideramos que estudos devem ser conduzidos com objetivo de descrever com maior análise os mecanismos de ação dos AAs provenientes do caju.

7. Anexo

7. Anexo

Anexo - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq - HCFMUSP)

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/03/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0114/07, intitulado: **"EFEITO DO ÁCIDO ANACÁRDICO EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À EXAUSTÃO DE PÓ DE DIESEL"** apresentado pelo Departamento de PATOLOGIA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: Profª. Drª. Thaís Mauad

Pesquisadora Executante: Ana Laura Nicoletti Carvalho

CAPPesq, 14 de março de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

8. Referências

8. Referências

- Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-26.
- Andrade Júnior DR, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol.* 2005; 31:60-8.
- Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond C. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem.* 2009; 390:191-214.
- Banerjee R. Redox Biochemistry. San Francisco: Wiley; 2008. p.318.
- Behndig AF, Mudway IS, Brown JL, Stenfors N, Helleday R, Duggan ST, Wilson SJ, Boman C, Cassee FR, Frew AJ, Kelly FJ, Sandstrom T, Blomberg A. Airway antioxidant and inflammatory responses to diesel exhaust exposure in healthy humans. *Eur Respir J.* 2006; 27:359-65.
- Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione. *Mol Aspects Med.* 2009, 30:60-76.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein dye-binding. *Anal Biochem.* 1976, 72:248-54.
- Bunn WB, Valberg PA, Slavin TJ, Lapin CA. What is new in diesel. *Int Arch Occup Environ Health.* 2002; 75:122-32.
- Calberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem.* 1975; 250:5475-80.
- Cavalcante AAM, Rubensam G, Picada JN, Silva EG, Moreira JCF, Henriques JAP. Mutagenicity, antioxidant potencial, and antimutagenic activity against

hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environ Mol Mutagen*. 2003; 41:360-9.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Relatório de qualidade do ar do Estado de São Paulo 2008. Série Relatórios - Secretaria do Estado do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB; 2008. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/AR>.

Collins T. Inflamação aguda e crônica. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.44-78.

Correia SJ, David JP, David JM. Metabólitos secundários de espécies de *Anacardiaceae*. *Quím. Nova* 2006; 29:1287-1300.

Dekker FJ, Haisma HJ. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug Discov Today*. 2009; 14:942-8.

Deleve LD, Kaplowitz N. Importance of regulation of hepatic glutathione. *Semin. Liver Dis*. 1990; 10:251-66.

Diaz-Sanchez D, Riedl M. Diesel effects on human health: a question of stress? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 289:722-3.

Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone, V. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol*. 2005; 2:1-10.

Dourado DFAR, Fernandes PA, Mannervik B, Ramos MJ. Glutathione Transferases: New Model for Glutathione Activation. *Chem Euro J*. 2008; 31:9591-98.

Elsayed NM. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition*. 2001; 10:828-34.

EPA (United States Environmental Protection Agency). Health Effects Test Guidelines. Acute Oral Toxicity. Prevention, Pesticides and Toxic Substances; OPPTS 870.1100; 2002.

EPA (United States Environmental Protection Agency). Health Effects Test Guidelines. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances; OPPTS 870.3050; 2000.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105:114-21.

Grazzini R, Hesk D, Heininger E, Hildenbrandt G, Reddy CC, Cox-Foster D, Medford J, Craig R, Mumma RO. Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 176:775-80.

Green IR, Tocoli FE, Lee SH, Nihei K, Kubo I. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15:6236-41.

Green IR, Tocoli FE, Lee SH, Nihei K, Kubo I. Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. *Eur J Med Chem.* 2008; 43:1315-20.

Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41:1819-28.

Ha TJ, Kubo I. Lipoxygenase inhibitory activity of anacardic acids. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:4350-4.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249:7130-9.

Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med.* 2003; 60:612-16.

Kelly FJ. Dietary antioxidants and environmental stress. *Proc Nutr Soc.* 2004; 63:579-85.

Kelly FJ. Vitamins and respiratory disease: antioxidant micronutrients in pulmonary health and disease. *Proc Nutr Soc.* 2005; 4:510-26.

Kinnula VL, Chang L, Everitt JI, Crapo JD. Oxidants and antioxidants in alveolar epithelial type II cells: *in situ*, freshly isolated, and cultured cells. *Am J Physiol.* 1992; 262:69-77.

Kinnula VL. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax.* 2005; 60:693-700.

Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and CPOD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 2006; 111:476-94.

Konan NA, Bacchi EM, Lincopan N, Varela SD, Varanda EA. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *J Ethnopharmacol.* 2007a; 110:30-8.

Konan NA, Bacchi EM. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. *J Ethnopharmacol.* 2007b; 112:237-42.

Kubo I, Ochi M, Vieira PC, Komatsu S. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *J Agric Food Chem.* 1993; 41:1012-5.

Kubo I, Kinst-Hori I, Yokokawa Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. *J Nat Prod.* 1994; 57:545-51.

Kubo J, Lee JR, Kubo I. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *J Agric Food Chem.* 1999; 47:533-7.

Kubo I, Nihei K, Tsujimoto K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Agric Food Chem.* 2003; 51:7624-8.

Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, Tsujimoto K. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chem.* 2006; 99:555-62.

Laks D, Oliveira RC, André PA, Macchione M, Lemos M, Faffe D, Saldiva PHN, Zin WA. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: An experimental study in mice. *Inhal Toxicol.* 2008; 20:1037-42.

Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tibério IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol.* 2006; 100:1610-6.

Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* 2001; 32:367-81.

MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margalin BH, Ramel C, Salamone MF, Tice RR, Will D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res.* 1987; 189:103-12.

Masuoka N, Kubo I. Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1688:245-9.

Melo AFM, Diniz MFFM, Santos HB, Silva MVB, Medeiros IA. Ensaios toxicológicos pré-clínicos agudos do extrato bruto da casca do caule de *Anacardium occidentale* L. em Ratos. *Rev Bras Ciênc Saúde.* 2004; 8:217-22.

Morais TC, Pinto NB, Carvalho KM, Rios JB, Ricardo NM, Trevisan MT, Rao VS, Santos FA. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. *Chem Biol Interact.* 2010; 183:264-9.

Mota ML, Thomas G, Barbosa Filho JM. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *J Ethnopharmacol.* 1985; 13:289-300.

Mudway IS, Stenfors N, Duggan ST, Roxborough H, Zielinski H, Marklund SL, Blomberg A, Frew AJ, Sandstrom T, Kelly FJ. An *in vitro* and *in vivo* investigation of the effects of diesel exhaust on human airway lining fluid antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 423:200-12.

Muroi H, Kubo I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol.* 1996; 80:387-94.

Narasimhan B, Panghal A, Singh N, Dhake AS. Efficiency of anacardic acid as preservative in tomato products. *J Food Process Preserv.* 2008; 32:600-9.

Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P, Donnelly LE, Rogers DF, Kinnersley R, Chung KF, Barnes PJ, Ashmore M, Newman-Taylor A. Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162:161-6.

Olajide OA, Aderogba MA, Adedapo AD, Makinde JM. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on *in vivo* inflammatory models. *J Ethnopharmacol.* 2004; 95:139-42.

Pacht ER, Timerman AP, Lykens MG, Merola AJ. Deficiency of alveolar fluid glutathione of patients with sepsis and ARDS. *Chest.* 1991; 100:1397-1403.

Pandya RJ, Solomon G, Kinner A, Balmes JR. Diesel exhaust and asthma: hypotheses and molecular mechanisms of action. *Environ Health Perspect.* 2002; 110:103-12.

Paramashivappa R, Phani Kumar P, Vithayathil PJ, Srinivasa Rao A. Novel Method for Isolation of Major Phenolic Constituents from Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 2548-51.

Paramashivappa R, Phani Kumar P, Subba Rao PV, Srinivasa Rao A. Design, synthesis and biological evaluation of benzimidazole/benzothiazole and benzoxazole derivatives as cyclooxygenase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003; 13:657-60.

Park S, Nam H, Chung N, Park JD, Lim Y. The role of iron in reactive oxygen species generation from diesel exhaust particles. *Toxicol In Vitro*. 2006;1-7.

Pope CA 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ. Cardiovascular Mortality and Long-Term Exposure to Particulate Air Pollution: Epidemiological Evidence of General Pathophysiological Pathways of Disease. *Circulation*. 2004; 109:71-7.

Praticò D, Lawson JA, Rokach J, Fitzgerald GA. The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab*. 2001; 12:243-7.

Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX, Greening A, MacNee W. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27:60–8.

Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J*. 2000; 16:534–54.

Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*. 2006; 28: 219-242.

Ramprasath VR, Shanthi P, Sachdanandam P. Anti-inflammatory effects of *Semecarpus anacardium* Linn. Nut extract in acute and chronic inflammatory conditions. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27:2028-31.

Ramprasath VR, Shanthi P, Sachdanandam P. Effects of *Semecarpus anacardium* Linn. Nut milk extract on rat neutrophil functions in adjuvant arthritis. *Cell Biochem Funct*. 2006; 24:333-40.

Riedl M, Diaz-Sanchez D. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115:221-8.

Romieu I, Castro-Giner F, Kunzli N, Sunyer J. Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *Eur Respir J.* 2008; 31:179-97.

Rover Jr L, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím. Nova*, 2001; 24:112-9.

Rudell B, Blomberg A, Helleday R, Ledin MC, Lundback B, Stjernberg N, Horstedt P, Sandstrom T. Bronchoalveolar inflammation after exposure to diesel exhaust: comparison between unfiltered and particle trap filtered exhaust. *Occup Environ Med.* 1999; 56:527-34.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005; 45:287-306.

Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A. (Ed.). Principles and methods for their detection. New York: Pleneem Press. 1976, v.4, p.31-53.

Shobha SV, Ramadoss CS, Ravindranath B. Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by anacardic acids, cardols and cardanols. *J Nat Prod.* 1994; 57:1755-7.

SPTTrans - São Paulo Transporte S.A. Indicadores/Frota contratada. Disponível em:<http://www.sptrans.com.br/indicadores/>.

Stenfors N, Nordenhall C, Salvi SS, Mudway I, Soderberg M, Blomberg A, Helleday R, Levin JO, Holgate ST, Kelly FJ, Frew AJ, Sandstrom T. Different airway inflammation responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J.* 2004; 23:82-6.

Stoeger T, Reinhard C, Takenaka S, Schroepel A, Karg E, Ritter B, Heyder J, Schulz H. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ Health Perspect.* 2006; 114:328-33.

Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stenfors N, Sandstrom T, Dahlén SE. Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J.* 2001; 17:733-46.

Sun Y, Jiang X, Chen S, Price BD. Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS J.* 2006; 279:4353-6.

Sung B, Pandey MK, Ahn KS, Yi T, Chaturvedi MM, Liu M, Aggarwal BB. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaBalpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood.* 2008; 111:4880-91.

Takizawa H. Diesel exhaust particles and their effect on induced cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004; 4:355-59.

Torres LHL. Efeitos da inalação da fumaça de cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2009.

Trevisan MTS, Spiegelhalter B, Bartsch H, Owen R, Wurtele G, Pfundstein B, Haubner R. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44:188-97.

Tsujimoto K, Hayashi A, Ha TJ, Kubo I. Anacardic acids and ferric ion chelation [abstract]. *Z Naturforsch C.* 2007; 62:710-6.

Vannuchi H, Moreira EAM, Cunha DF, Junqueira-Franco MM, Bernardes MM, Jordão-Jr AA. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 1998; 31:31-44.

Vijayalakshmi T, Muthulakshmi V, Sachdanandam P. Effect of the milk extract of *Semecarpus anacardium* Linn. On adjuvant arthritis- A dose-dependent study in wistar albino rats. *Gen Pharmac*. 1996; 27:1223-6.

Wang T, Chiang ET, Moreno-Vinasco L, Lang GD, Pendyala S, Samet JM, Geyh AS, Breysse PN, Chillrud SN, Natarajan V, Garcia JGN. Particulate matter disrupts human lung endothelial barrier integrity via ROS- and p38 MAPK-dependent pathways. *J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42:442-49.

Yoshizaki K, Brito JM, Toledo AC, Nakagawa NK, Piccin VS, Junqueira MS, Negri EM, Carvalho AL, Ligeiro de Oliveira AP, Tavares de Lima W, Saldiva PH, Mauad T, Macchione M. Subchronic effects of nasally instilled diesel exhaust particulates on the nasal and airway epithelia in mice. *Inhal Toxicol*. 2010; 22:610-7.

Zin WA, Laks DM, Mazzoli F, Magalhaes CB, Riva DR, Barbosa DF, Saldiva PHN, Faffe DS. Lung inflammatory response after acute exposure to diesel in mice [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175:584.

Apêndice

Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice

Ana Laura Nicoletti Carvalho^a, Raquel Annoni^a, Paula Regina Pereira Silva^a,
Primavera Borelli^b, Ricardo Ambrósio Fock^b, Maria Teresa Salles Trevisan^c,
Thais Mauad^{ad}.

^a Experimental Atmospheric Pollution Laboratory (LPAE), Department of Pathology, São Paulo Medical School, University of São Paulo, Av Dr Arnaldo, 455, room 1155, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil.

^b Experimental Hematology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av Prof Lineu Prestes, 580/17, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

^c Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, CP 12200,60451-970 Fortaleza, CE, Brazil.

^d National Institute for Integrated Analysis of Environmental Risk (INAIRA), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, for the development of National Institutes of Science and Technology (MCT), Av Dr Arnaldo, 455, room 1220, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding Author:

Ana Laura Nicoletti Carvalho, B.Sc.

São Paulo University Medical School, Av Dr Arnaldo 455, room 1155, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil. Tel: + 55 (11) 30617173. Fax: + 55 (11) 30628098
e-mail: anauranc@yahoo.com.br

Email addresses

ALNC: anauranc@yahoo.com.br, RA: rqannoni@yahoo.com.br, PRPS: preginahpv@usp.br, PB: borelli@usp.br, RAF: hemato@usp.br, MTST: trevisan@ufc.br, TM: tmauad@usp.br

Abstract

Aim of the study

Anacardium occidentale Linn. (cashew) is a Brazilian plant that is usually consumed *in natura* and is used in folk medicine. Anacardic acids (AAs) in the cashew nut shell liquid are biologically active as gastroprotectors, inhibitors of the activity of various deleterious enzymes, antitumor agents and antioxidants. Yet, there are no reports of toxicity testing to guarantee their use *in vivo* models.

Materials and Methods

We evaluated AAs biosafety by measuring the acute, subacute and mutagenic effects of AAs administration in BALB/c mice. In acute tests, BALB/c mice received a single oral dose of 2000 mg/kg, whereas animals in subacute tests received 300, 600 and 1000 mg/kg for 30 days. Hematological, biochemical and histological analyses were performed in all animals. Mutagenicity was measured with the acute micronucleus test 24 hours after oral administration of 250 mg/kg AAs.

Results

Our results showed that the AAs acute minimum fatal dose in BALB/c mice is more than 2000 mg/kg since this concentration did not produce any symptoms. In subacute tests, females which received the highest doses (600 or 1000 mg/kg) were more susceptible, which was seen by slightly decreased hematocrit and hemoglobin levels coupled with a moderate increase in urea. Anacardic acids did not produce any mutagenic effects.

Conclusions

The data suggest that doses less than 300 mg/kg cause no adverse effects in BALB/c mice and could be used safely *in vivo*. Additional studies must be conducted to investigate the potential of this natural substance.

1. Introduction

Cashew, *Anacardium occidentale* Linn., is a tropical tree native to northeast Brazil. Cashew apples (pseudofruit) and nuts can be consumed *in natura* and converted into various nutritional products (juice, tea, jam and beverages), (Kubo et al., 1993; Trevisan et al., 2006). Cashew nut shell liquid (CNSL) is used in industrial applications such as food preservatives, paints, cements and for gasoline stabilization; as such, it is an important commercial product in several tropical countries (Narasimhan et al., 2008, Paramashivappa et al., 2001; Trevisan et al., 2006).

In addition, this plant has been widely used in folk medicine in Brazil, India and Africa to treat inflammation, gastrointestinal diseases and hypertension (Cavalcante et al., 2003; Mota et al., 1985; Konan et al., 2007b). Several studies have evaluated the biological effects and pharmaceutical potential of cashew tree extracts and parts. For instance, pre-treatment with 200 mg/kg of the methanol extract of *Anacardium occidentale* stem bark completely protected against lipopolysaccharide-induced septic shock in Swiss mice (Olajide et al., 2004). Hydroethanolic extract from cashew leaves, which are rich in polyphenols, inhibited gastric lesions induced by HCl/ethanol in female rats (Konan et al., 2007b). Finally, a mixture of condensed and

hydrolysable tannins from the bark of *Anacardium occidentale* L. showed anti-inflammatory activity (Mota et al., 1985).

Cashew apple, nut (raw and roasted) and cashew nut shell liquid (CNSL) contain a range of alkyl phenols such as anacardic acids (AAs), cardanols and cardols. The highest levels of AAs were detected in CNSL (353.6 g/kg), followed by cashew fiber (6.1 g/kg) and roasted cashew nut (0.65 g/kg) (Trevisan et al., 2006). Cashew apples and fiber contained mainly AAs, whereas CNSL contained an abundance of cardanols and cardols in addition to AAs (Trevisan et al., 2006).

CNSL is a cheap and renewable by-product obtained during cashew nut processing (Paramashivappa et al., 2001; Rodrigues et al., 2006). As a unique, natural source of unsaturated long-chain phenols, CNSL is being used in insecticidal, fungicidal and medicinal applications. For instance, in the hypoxanthine/xanthine oxidase assay, CNSL is a potent scavenger of reactive oxygen species (ROS) (Trevisan et al., 2006). Anacardic acids have been described as the main active compound in CNSL, and evidence suggests that the phytol side-chain, along with the phenolic ring system (as salicylic acid), drives its great antioxidant capacity (Trevisan et al., 2006). Cavalcante et al. (2003) measured protection of DNA damage from ROS and showed that fresh cashew apple juice (CAJ) has higher antioxidant capacities than the processed juice (cajuína). Interestingly, there was a correlation between antioxidant properties and the AAs content in CAJ (17.9 mg/100 g) and in cajuína (0.41 mg/100 g).

AAs have other diverse biological effects including the following: 1) antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and anti *Helicobacter pylori* (Green et al., 2007; Kubo

et al., 1999; Kubo et al., 2003; Muroi and Kubo, 1996), 2) gastroprotection (Morais et al., 2010), and 3) inhibition of enzymes such as lipoxygenase (Ha and Kubo, 2005; Shobha et al., 1994), tyrosinase (Kubo et al., 1994), cyclooxygenase (Grazzini et al., 1991; Ha and Kubo, 2005; Paramashivappa et al., 2003) and histone acetyltransferases (Sun et al., 2006; Dekker and Haisma, 2009). Sung et al. (2008) have demonstrated that AAs modulate the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway through a variety of stimuli and suggested that AAs could be a therapeutic option for cancer prevention or treatment.

In order to investigate the clinical potential of this natural substance, pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicity testing still has to be performed in animal models. To the best of our knowledge, no toxicity or mutagenicity tests using AAs *in vivo* have been performed. Therefore, in the present study, we describe toxicological and mutagenicity tests that investigated the biosafety of AAs in BALB/c mice.

2. Materials and methods

This study was approved by the Ethical Committee of São Paulo University Medical School.

2.1 Plant material

The cashews (*Anacardium occidentale* Linn.) were harvested at the Embrapa Tropical Agroindustry Experimental Station, located in Paraipaba, Ceará, Brazil during the 2007 season. The fruits were from a commercial cultivar (CCP-76), genetic material from which is maintained on the Embrapa's germplasm bank. The fresh cashew apples were manually separated from the

nuts and were provided as a kind gift from Dr. Edy Sousa de Brito (Embrapa, Fortaleza, Brazil).

Cashew nut shell liquid (300 g) was obtained by heating (175°C) the fruit (1 kg) in an oven for 45 min. The cashew nut oil (2 L) was obtained from cashew nuts subjected to Soxhlet extraction with hexane (3 h).

2.2 Extraction and isolation of anacardic acids

Extracted CNSL (200 g) was dissolved in 5% aqueous methanol (1200 mL) and calcium hydroxide (100 g) was added while stirring. The mixture was kept at 50 °C stirring for 3 h. The supernatant solution was monitored using two-dimensional thin layer chromatography (TLC) to test for the absence of anacardic acids. The precipitated calcium anacardate was filtered and washed with methanol. Calcium anacardate was then dissolved in distilled water acidified with 11 M HCl. The solution was extracted with ethyl acetate; the ethyl acetate layer was washed with distilled water and dried over anhydrous sulfate, then concentrated under reduced pressure to yield 120 g of AAs mixture, as described by Paramashivappa et al. (2001). All of the structures were established by comparing spectral and physical data with those previously reported in the literature (Trevisan et al., 2006) and by direct comparison with authentic samples. Figure 1 depicts the structure of the AAs isolated from CNSL.

2.3 Animals

Male and female BALB/c mice (20-25 g) were obtained from the animal facility of São Paulo Medical School, University of São Paulo. All animals received

care in compliance with the “Principles of Laboratory Animal Care” published by the National Institutes of Health (NIH publication #85-23, revised in 1985). Animals were housed in group-cages by sex at 22-26°C with a 12-h/12-h light/dark cycle and received *ad libitum* water and commercial pellet food for small rodents from Nuvital (Nuvilab CR-1; Colombo, Brazil).

2.4 Anacardic acids toxicity tests

These protocols were developed according to the United States Environmental Protection Agency Guidelines for Acute Oral Toxicity (2002) and Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents (2000).

2.4.1 Oral acute toxicity

BALB/c mice were randomly divided into three groups (control, cashew nut oil, anacardic acids), with five males and five females in each group. A single, maximum dose of 2000 mg/kg body weight (b.w.) of AAs dissolved in cashew nut oil was orally administered (Konan et al., 2007a). The animals in the control (Ctrl) and the cashew nut oil (CNO) groups received 2000 mg/kg b.w. of water and 2000 mg/kg b.w. of cashew nut oil, respectively. Following treatment, the animals were observed closely for 14 days. Animals received daily clinical examinations for signs and symptoms of toxicity and death. Signs and symptoms of toxicity included the following: 1) skin, fur, eyes and mucous membranes evaluations, 2) autonomic effects such as salivation, 3) central nervous system effects such as tremors and convulsions and 4) changes in the level of activity, posture, strength and bizarre behavior. We also measured body weight as well as food (g) and water (mL) consumption on a daily basis.

Necropsies were performed on any animals that died during the 14-day period, and on the survivors at the end of the experimental protocol.

2.4.2 Subacute oral toxicity

BALB/c mice were divided into five groups of 10 animals, with each one containing males (n=5) and females (n=5). Each group received daily, oral doses of 100 μ L water (Ctrl), 100 μ L cashew nut oil (CNO), 300 mg/kg b.w. (A300), 600 mg/kg b.w. (A600) and 1000 mg/kg b.w. (A1000) of anacardic acids dissolved in 100 μ L of cashew nut oil. During the 30-day study, the animals were evaluated for toxic signs and symptoms, and body weights were measured weekly.

2.5 Biochemical and hematological analysis

At the end of the protocol, all animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (40 mg/kg) and then sacrificed by exsanguination. Blood was collected from the axillary vein for biochemical and hematological analyses. We evaluated renal and hepatic function, through serum creatinine, urea, serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP). We also determined white and red blood cell counts, hemoglobin and hematocrit levels.

2.6 Histopathology

After blood collection, vital organs such as lungs, heart, liver, kidney, spleen and pancreas were removed and weighed. The collected organs were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Histology sections (4- μ m

thick) were stained with hematoxylin and eosin for evaluating histological alterations.

2.7 Acute micronucleous test

Seven-week-old BALB/c mice were divided into four groups (each one containing five males and five females). The test group received a single oral dose at 250 mg/kg b.w. of anacardic acid dissolved in 100 μ L of cashew nut oil. The positive control group received 1 mL/100 g b.w. of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) solution diluted in 0.9% NaCl at a concentration of 50 mg/kg that was administered intraperitoneally. The negative controls received the same dose of 0.9% saline solution alone. The fourth group received 100 μ L of cashew nut oil orally.

The micronucleus test was conducted according to established protocol (MacGregor et al., 1987). Briefly, after 24 hours animals were euthanized. The content of femoral bone marrow was obtained from each animal immediately after sacrificing. Samples were homogenized with 3 mL of fetal bovine serum (Gibco, Miami, USA) and centrifuged for 5 min to obtain a homogenous suspension of cells. Next, drops of this suspension were smeared on two slides for each animal. After 24 h of drying at room temperature, the slides were stained with Leishmann (eosin-methylene blue, Merck, Darmstadt, Germany). The frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) was determined by analyzing 1000 polychromatic erythrocytes (ECPs) per animal. The slides were blindly scored using light microscopy with a 1000x oil-immersion objective. Micronucleus identification was done according to the criteria adopted by Schmid (1976).

2.8 Data analysis

Parametric and nonparametric data were expressed as means $\pm$ SD or as medians and interquartile ranges, respectively. Comparisons among female and male groups were performed separately, using the one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc (parametric data) or Kruskal-Wallis (nonparametric data) tests. A p -value of <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1 Acute toxicity

During the 14-day experiment, no death, toxic signs and negative symptoms were observed in any animal. Table 1 shows food and water consumption in males and females between the groups analyzed. There was no statistical difference in the food intake between groups in both sexes. There was an increase in water consumption in the female animals in the group that received AAs compared with animals in the CNO and Ctrl groups ($p<0.05$). There were no differences in weight gain between the groups in both sexes. No apparent macroscopic or microscopic changes were observed in the organs analyzed; however, there was a decrease in the lung/body weight ratio in males treated with AAs compared to males in the other groups ($p<0.05$). Table 2 shows the effects of anacardic acids on the weights of principal organs.

Data in Tables 3 and 4 show no alterations in hematological parameters in females and males in all groups. Females showed altered biochemical measures, including increased ALT and AST in the CNO group compared to control ($p<0.05$); in contrast, AST was elevated in the AAs group compared to

Ctrl ($p<0.05$). Urea decreased in the AAs group compared to the CNO group ($p<0.05$).

According to our results, the acute minimum fatal dose of anacardic acids for BALB/c mice is higher than 2000 mg/kg b.w.

3.2 Subacute toxicity

During the 30 days following exposure, no animals died or showed toxic symptoms from any of the doses. All animals gained weight, without a statistical difference between the animals in either sex. We did not observe histopathological changes in microscopic and macroscopic analysis. There was an increase in the spleen weight/body weight ratio (Table 5) in males in the A600 group compared with males in the CNO and Ctrl groups ($p<0.05$). The same ratio decreased in males in the A1000 group compared with males in the A300 and A600 groups ($p<0.05$). Among the females, animals in the A600 group showed an elevated spleen weight/body weight ratio compared with females in the other groups ($p<0.05$). Hematological and biochemical changes were only observed in females that received 1000 mg/kg of AAs. Hemoglobin decreased in females in the A1000 group compared with Ctrl ($p<0.05$). Hematocrit analysis also showed decreased levels in females in the A1000 group compared with CNO and Ctrl groups ($p<0.05$). There was an increase in urea in females in the A1000 group compared to Ctrl ($p<0.01$), CNO and A600 groups ($p<0.05$). Tables 6 and 7 show hematological and biochemical data.

3.3 Bone marrow micronucleus test in mice

Treatment with MNU (Table 8) showed a significant elevation in the frequency of micronuclei compared to animals that received a single dose of AAs, CNO and Ctrl, with a significant difference between the groups ($p < 0.05$).

4. Discussion

AAs from cashews have many important biological effects (Green et al., 2008; Kubo et al., 2006; Masuoka and Kubo, 2004; Morais et al., 2010; Sung et al., 2008). In this study, we tested the acute and subacute toxicity of AAs extracted from CNSL in mice. Our results show that the 50% lethal dose (LD 50) is more than 2000 mg/kg. Mild signs of toxicity were mainly observed in female mice with increased water consumption and serum levels of AST. In the subacute test, no abnormalities were observed in animals that received 300 mg/kg. There were mild abnormalities in females that received the highest doses (600 or 1000 mg/kg). Abnormalities included slight decreases in hematocrit and hemoglobin levels (approximately 10% and 12% less than Ctrl, respectively) and moderate increases in urea (approximately 40% more than Ctrl). No deaths were observed in any of the treatment groups. Animals that received 300 mg/kg had no alterations in any of the studied variables, and thus data indicate that this dose is safe because it is not associated with biochemical and hematological effects in BALB/c mice. To our knowledge, this is the first report testing *in vivo* toxicity of AAs.

In the present study, we determined that the LD 50 is more than 2000 mg/kg. In line with our findings, previous acute toxicity tests with hydroethanolic extracts of cashew have also found LD 50 values in Swiss mice and Wistar rats greater than 2000 mg/kg (Konan et al., 2007a, 2007b).

The LD 50 value in mice for tannins from the trunk bark of *Anacardium occidentale* was 944.1 mg/kg b.w. and 10% death occurred with highest dose of 4 g/kg (Mota et al., 1985).

The acute toxicity tests showed that the most important alterations were in females, which increased their water consumption and AST serum levels. The female CNO group showed elevated levels of ALT compared with Ctrl (approximately 43% more than Ctrl). Cashew nut oil contains 80% of oleic acid and an insignificant amount of anacardic acids (0.0001 mg/mL).

According to Melo et al. (2004), acute pre-clinical toxicity of dry bark extract from *Anacardium occidentale* L. increased AST and ALT 14 days after animals received a single 5 g/kg dose; however, 21 days after exposure, hepatic enzymes levels were normal. Elevated ALT and AST serum levels, combined with histopathological evidence, are used to identify acute hepatocellular injury, which is essential for investigating and recognizing chemical-induced liver toxicity (Ramaiah, 2007).

Slightly decreased levels of urea were observed in females that received AAs compared with animals in the CNO group; however, the values were within the range of biochemical reference values (51.2 ± 15.92) for BALB/c mice (Almeida et al., 2008). In our study, no alterations in liver or kidney morphology were observed. Taken together, our findings suggest that AAs cause mild, acute toxicity in mice and that these changes are expected and probably transient considering the high limit dose.

During the 30-day subacute test with AAs no hematological or biochemical changes were observed in animals that received 300 mg/kg of AAs. Most changes occurred in females that received the highest doses. BALB/c females that received 1000 mg/kg, the highest AAs dose, showed

slightly decreased levels of hematocrit and hemoglobin compared to the Ctrl and CNO groups. Hemoglobin values in all female study groups are consistent with those reported by Barrios et al. (2009) and Tsai et al. (2002) in control mice. The hematocrit values obtained in the present study were lower than those described by other authors (Mazzaccara et al., 2008; Nemzek et al., 2001); however, when compared with values in the reference guide of the Animal Facility of the São Paulo Medical School at the University of São Paulo (2000), hematocrit values for the female A1000 mg/kg group were still within the local reference ranges (33.2 ± 3.8 Animal Facility vs. 34.34 ± 1.68 A1000). Based on the hematological data in the female group that received the dose of 1000 mg/kg of AAs, we cannot exclude that chronic supplementation of high AAs doses could lead to anemia.

Renal function was evaluated by urea and creatinine serum levels. In the females in the A1000 group, serum urea was elevated compared to the Ctrl, CNO and A600 groups. Further, elevated urea levels were not accompanied by increases in creatinine levels (Satyanarayana et al., 2001), and there were no evident histopathological changes in the kidney tissue. Therefore, the significance of the increased urea levels in the A1000 group is unclear.

The spleen/body weight ratio increased in females in the A600 group compared to females in the Ctrl, CNO and A1000 groups. Among males, results were not as clear-cut because spleen weights increased in males in the A600 group compared with Ctrl and CNO groups, but it decreased in males in the A1000 group compared with males in the A300 and A600 groups. These alterations are difficult to interpret and could reflect different stimuli induced by each particular AAs doses in the hematological system.

However, no leukocyte changes were observed in the peripheral blood, and there were no striking histopathological changes in the spleen tissue in any groups. Further, we cannot exclude the possibility that terminal blood congestion within the spleen influenced the organ weight in an erratic manner.

Finally, we performed a mutagenicity analysis to evaluate whether a dose below 300 mg/kg damages chromosomes. Our results show that treatment with 250 mg/kg AAs and CNO did not increase the frequency of micronuclei when compared to a positive control. Similarly, Acevedo et al. (2006) have described this micronucleus assay at 24, 48 and 72 h after oral administration of 0.75, 2.5, 5.0 and 10.0 mg/kg of AAs isolated from the bark of *Amphipterygium adstringens* and found no evidence of cytotoxic activity in CD1 mice.

5. Conclusion

Anacardic acids are increasingly recognized as potential anti-inflammatory and anti-cancer substances. However, so far, there are very few *in vivo* studies on these compounds. Morais et al. (2010) have suggested that gastroprotection from AAs at 10, 30 and 100 mg/kg is mainly through an antioxidant mechanism. Our data suggest that doses less than 300 mg/kg caused no adverse effects in BALB/c mice and could be used safely *in vivo*. Additional *in vivo* studies should be conducted in order to evaluate the effects of AAs for the development of new drugs or treatments with this promising Brazilian plant compound.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil, Proc. No. 2007/05033-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil).

References

- Acevedo, H.R., Rojas, M.D., Arceo, S.D., Soto Hernández, M., Martínez Vázquez, M., Terrazas, T., del Toro, G.V., 2006. Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research* 609, 43-46.
- Almeida, A.S., Faleiros, A.C.G., Teixeira, D.N.S., Cota, U.A., Chica, J.E.L., 2008. Reference values for blood-based biochemical parameters in BALB/c and C57BL/6 wild-type mice. *Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine* 44, 429-432.
- Barrios, M., Rodríguez-Acosta, A., Gil, A., Salazar, A.M., Taylor, P., Sánchez, E.E., Arocha-Piñango, C.L., Guerrero, B., 2009. Comparative hemostatic parameters in BALB/c, C57BL/6 and C3H/He mice. *Thrombosis Research* 124, 338-343.
- Cavalcante, A.A.M., Rubensam, G., Picada, J.N., Silva, E.G., Moreira, J.C.F., Henriques, J.A.P., 2003. Mutagenicity, antioxidant potencial, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41, 360-369.
- Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Parâmetros Biológicos dos principais animais de experimentação fornecidos pelo biotério central FMUSP. 2000. Available in: <http://www.biot.fm.usp.br/site1/index-2.html>. Accessed at: February 10, 2010.
- Dekker, F.J., Haisma, H.J., 2009. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug Discovery Today* 14, 942-948.
- EPA. 2002. Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.1100. Acute Oral Toxicity. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101). EPA 712-C-02-190.
- EPA. 2000. Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.3050. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101). EPA 712-C-00-366.
- Grazzini, R., Hesk, D., Heininger, E., Hildenbrandt, G., Reddy, C.C., Cox-Foster, D., Medford, J., Craig, R., Mumma, R.O., 1991. Inhibition of lipoxigenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. *Biochemical Biophysical Research Communications* 176, 775-780.

Green, I.R., Tocoli, F.E., Lee, S.H., Nihei, K., Kubo, I., 2007. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15, 6236-6241.

Green, I.R., Tocoli, F.E., Lee, S.H., Nihei, K., Kubo, I., 2008. Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43, 1315-1320.

Ha, T.J., Kubo, I., 2005. Lipxygenase inhibitory activity of anacardic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4350-4354.

Konan, N.A., Bacchi, E.M., Lincopan, N., Varela, S.D., Varanda, E.A., 2007a. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Ethnopharmacology* 110, 30-38.

Konan, N.A., Bacchi, E.M., 2007b. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 237-242.

Kubo, I., Masamitsu, O., Vieira, P.C., Sakae, K., 1993. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1012-1015.

Kubo, I., Kinst-Hori, I., Yokokawa, Y., 1994. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. *Journal of Natural Products* 57, 545-551.

Kubo, J., Lee, J.R., Kubo, I., 1999. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 533-537.

Kubo, I., Nihei, K., Tsujimoto, K., 2003. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7624-7628.

Kubo, I., Masuoka, N., Ha, T.J., Tsujimoto, K., 2006. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chemistry* 99, 555-562.

MacGregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margalin, B.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., Will, D., 1987. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research* 189, 103-112.

Masuoka, N., Kubo, I., 2004. Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1688, 245-249.

Mazzaccara, C., Labruna, G., Cito, G., Scarfò, M., De Felice, M., Pastore, L., Sacchetti, L., 2008. Age-Related Reference Intervals of the Main Biochemical and Hematological Parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains. *PLoS One* 3, e3772.

Melo, A. F.M., Diniz, M.F.F.M., Santos, H.B., Silva, M.V.B., Medeiros, I.A., 2004. Ensaio toxicológicos pré-clínicos agudos do extrato bruto da casca do caule de *Anacardium occidentale* L. em Ratos. Revista Brasileira de Ciências da Saúde 8, 217-222.

Morais, T.C., Pinto, N.B., Carvalho, K.M., Rios, J.B., Ricardo, N.M., Trevisan, M.T., Rao, V.S., Santos, F.A., 2010. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. Chemico Biological Interactions 183, 264-269.

Mota, M.L., Thomas, G., Barbosa Filho, J.M., 1985. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. Journal of Ethnopharmacology 13, 289-300.

Muroi, H., Kubo, I., 1996. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Bacteriology 80, 387-394.

Narasimhan, B., Panghal, A., Singh, N., Dhake, A.S., 2008. Efficiency of anacardic acids as preservative in tomato products. Journal of Food Processing and Preservation 32, 600-609.

Nemzek, J.A., Bolgos, G.L., Williams, B.A., Remick, D.G., 2001. Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. Inflammation Research 50, 523-527.

Olajide, O.A., Aderogba, M.A., Adedapo, A.D., Makinde, J.M., 2004. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on *in vivo* inflammatory models. Journal of Ethnopharmacology 95, 139-142.

Paramashivappa, R., Phani Kumar, P., Vithayathil, P.J., Srinivasa Rao, A., 2001. Novel Method for Isolation of Major Phenolic Constituents from Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 2548-2551.

Paramashivappa, R., Phani Kumar, P., Subba Rao, P.V., Srinivasa Rao, A., 2003. Design, synthesis and biological evaluation of benzimidazole/benzothiazole and benzoxazole derivatives as cyclooxygenase inhibitors. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 13, 657-660.

Ramaiah, S.K., 2007. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. Food and Chemical Toxicology 45, 1551-1557.

Rodrigues, F.H.A., Feitosa, J.P.A., Ricardo, N.M.P.S., França, F.C.F., Carioca, J.O.B., 2006. Antioxidant Activity of Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) Derivatives on the Thermal Oxidation of Synthetic cis-1,4-Polyisoprene. Journal of Brazilian Chemistry Society 17, 265-271.

Satyanarayana, P.S., Singh, D., Chopra, K., 2001. Quercetin, a bioflavonoid, protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cyclosporine in rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 23, 175-181.

Schmid, W., 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis, in: Hollaender, A. (Ed.), *Principles and methods for their detection*. Pleneem Press, New York, pp. 31-53.

Shobha, S.V., Ramadoss, C.S., Ravindranath, B., 1994. Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by anacardic acids, cardols and cardanols. *Journal of Natural Products* 57, 1755-1757.

Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Price, B.D., 2006. Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *Federation of European Biochemical Societies* 580, 4353-4356.

Sung, B., Pandey, M.K., Ahn, K.S., Yi, T., Chaturvedi, M.M., Liu, M., Aggarwal, B.B., 2008. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappa B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappa B alpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* 111, 4880-4891.

Tsai, P.P., Pachowsky, U., Stelzer, H.D., Hackbarth, H., 2002. Impact of environmental enrichment in mice. 1: effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Laboratory Animals* 36, 411-419.

Trevisan, M. T. S., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Owen, R., Wurtele, G., Pfundstein, B., Haubner, R., 2006. Characterization of alkyl phenols in Cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology* 44, 88-197.

List of Tables

Table 1 – Food and water consumption during acute treatment with anacardic acids

Table 2 – Acute treatment effects of anacardic acids on organ weight in mice

Table 3 – Acute toxicity effects of anacardic acids on hematological parameters in mice

Table 4 – Acute toxicity effects of anacardic acids on biochemical parameters in mice

Table 5 – Subacute toxicity effects of anacardic acids on organs weight of mice

Table 6 – Subacute toxicity effects of anacardic acids on hematological parameters in mice

Table 7 – Subacute toxicity effects of anacardic acids on biochemical parameters in mice

Table 8 – Frequency of micronucleated, immature erythrocytes 24 hours after acute treatment with anacardic acids in mice

Figure Caption

Figure 1

Title: Chemical structure of anacardic acids

Description of illustration: (a) $C_{22}H_{36}O_3$ (b) $C_{22}H_{34}O_3$ (c) $C_{22}H_{32}O_3$ (d) $C_{22}H_{30}O_3$

Table 1 – Food and water consumption during acute treatment with anacardic acids

	Control	Cashew nut oil	Anacardic acids
Water (mL/day)			
Males	8.26±0.47	8.73±0.42	8.58±0.57
Females	7.60±0.70	7.57±0.54	8.73±0.45 ^a
Food (g/day)			
Males	3.99±0.23	4.37±0.71	4.28±0.52
Females	3.62±0.27	3.52±0.57	4.11±0.52

Values are expressed as mean ± SD.

^a $p < 0.05$, statistically significant from control and cashew nut oil.

Table 2 – Acute treatment effects of anacardic acids on organ weight in mice

Organs	Control	Cashew nut oil	Anacardic acids
Males			
Lung/b.w. (%)	1.92±0.11	1.92±0.66 ^a	1.57±0.32 ^b
Liver/ b.w. (%)	5.99 ±0.21	6.10±0.51	5.76±0.58
Spleen/ b.w. (%)	0.41±0.05	0.41±0.02	0.42±0.35
Heart/ b.w. (%)	0.45±0.58	0.47±0.49	0.46±0.06
Kidney/ b.w. (%)	1.56±0.12	1.76±0.13	1.67±0.95
Females			
Lung/ b.w. (%)	1.87±0.27	2.16±0.17	2.00±0.22
Liver/ b.w. (%)	5.42±0.40	5.53±0.28	5.46±0.20
Spleen/ b.w. (%)	0.47±0.50	0.46±0.02	0.47±0.35
Heart/ b.w. (%)	0.47±0.30	0.47±0.08	0.47±0.13
Kidney/ b.w. (%)	1.32±0.63	1.30±0.28	1.34±0.27

Values are expressed as mean ± SD.

b.w. = body weight.

^a $p < 0.05$ statistically significant compared with anacardic acids.

^b $p < 0.05$ statistically significant compared with control.

Table 3 - Effects of acute toxicity of anacardic acids on hematological parameters in mice

Organs	Control	Cashew nut oil	Anacardic acids
Males			
Hemoglobin (g/dL)	12.92±1.33	13.72±2.32	13.66±2.54
Hematocrit (%)	39.88±3.97	40.42±5.62	43.22±7.05
Erythrocytes (x10 ⁶ /mm ³)	8.16±1.00	7.93±0.69	8.46±1.43
Leukocytes (/mm ³)	4740.00±2114.94	5875.00±1212.09	4600.00±734.84
Lymphocytes (%)	82.58±4.36	81.74±4.54	84.06±2.49
Monocytes (%)	7.22±1.94	6.40±1.50	6.52±1.03
Neutrophils (%)	10.20 ±5.05	11.86±4.73	9.42±2.28
Females			
Hemoglobin (g/dL)	13.78±1.95	14.14±2.61	13.76±1.42
Hematocrit (%)	42.84±6.06	43.22±7.05	43.04±4.57
Erythrocytes (x10 ⁶ /mm ³)	8.81±1.25	7.58±0.77	8.83±0.85
Leucocytes (/mm ³)	3120.00±1314.15	2840.00±581.37	3480.00±1366.38
Lymphocytes (%)	75.60±7.64	78.06±5.06	75.58±4.23
Monocytes (%)	7.28±0.55	6.96±1.40	7.00±1.49
Neutrophils (%)	17.12±8.09	16.98±5.78	17.42±4.95

Values are expressed as mean ± SD.

Table 4 – Acute toxicity effects of anacardic acids on biochemical parameters in mice

Parameters	Control	Cashew nut oil	Anacardic acids
Males			
ALT(U/L)	50.40±12.19	41.00±8.24	48.00±29.25
AST(U/L)	182.40±90.27	116.00±24.22	163.20±132.40
ALP(U/L)	100.20±13.48	104±18.56	101.60±29.08
Creatinine (mg/dL)	2.38±0.75	1.80±0.20	1.56±0.15
Urea (mg/dL)	57.40±10.73	55.75±7.80	64.20±9.88
Females			
ALT(U/L)	43.60±12.36	62.40±7.26 ^a	58.00±5.89
AST(U/L)	183.40±20.04	297.40±81.86 ^b	276.80±39.43 ^b
ALP(U/L)	87.20±23.88	72.60±16.68	72.80±17.35
Creatinine (mg/dL)	2.12±0.27	1.74±0.45	1.58±0.44
Urea (mg/dL)	63.80±8.52	74.60±6.98	59.00±9.46 ^c

Values are expressed as mean ± SD.

^a $p<0.05$ statistically significant from control.

^b $p<0.05$ statistically significant from control.

^c $p<0.05$ statistically significant from cashew nut oil.

Table 5 – Subacute toxicity effects of anacardic acids on organs weight of mice

Organs	Control	Cashew nut oil	AAs 300 mg/kg	AAs 600 mg/kg	AAs 1000 mg/kg
Males					
Lung/ b.w. (%)	1.64±0.19	1.91±0.14	1.78±0.26	1.85±0.10	1.69±0.25
Liver/ b.w. (%)	5.00±0.30	5.11±0.72	5.09±0.18	5.49±0.31	5.72±0.86
Spleen/ b.w. (%)	0.36±0.34	0.35±0.37	0.41±0.14	0.44±0.41 ^a	0.34±0.40 ^b
Heart/ b.w. (%)	0.46±0.16	0.47±0.69	0.48±0.61	0.46±0.09	0.50±0.30
Kidney/ b.w. (%)	1.42±0.70	1.47±0.69	1.52±0.13	1.51±0.11	1.60±0.12
Females					
Lung/ b.w. (%)	2.01±0.36	2.26±0.32	2.05±0.35	2.27±0.28	1.95±0.11
Liver/ b.w. (%)	5.10±0.12	5.06±0.21	5.15±0.28	5.58±0.50	5.09±0.38
Spleen/ b.w. (%)	0.49±0.35	0.45±0.25	0.53±0.33	0.59±0.81 ^{cd}	0.47±0.48
Heart/ b.w. (%)	0.45±0.33	0.45±0.40	0.45±0.28	0.47±0.41	0.42±0.14
Kidney/ b.w. (%)	1.32±0.06	1.20±0.12	1.30±0.12	1.36±0.12	1.32±0.13

Values are expressed as mean ± SD.

AAs=anacardic acids.

b.w.= body weight.

^a $p < 0.05$ statistically significant from control and cashew nut oil.

^b $p < 0.05$ statistically significant from AAs 300 mg/kg and 600 mg/kg.

^c $p < 0.05$ statistically significant from control and cashew nut oil.

^d $p < 0.01$ statistically significant from AAs 1000 mg/kg.

Table 6 – Subacute toxicity effects of anacardic acids on hematological parameters in mice

Parameters	Control	Cashew nut oil	AAs 300 mg/kg	AAs 600 mg/kg	AAs 1000 mg/kg
Males					
Hemoglobin (g/dL)	12.84±1.01	13.12±1.45	12.88±1.72	11.93±0.61	11.50±0.94
Hematocrit (%)	39.34±3.73	40.36±4.36	39.24±6.05	35.96±1.75	35.50±3.89
Erythrocytes (x10 ⁶ /mm ³)	8.24±0.68	8.41±0.72	8.56±0.98	7.56±0.44	7.83±0.79
Leukocytes (/mm ³)	2520.00±356.37	3520.00±1546.60	3180.00±580.51	3000.00±667.08	3260.00±1487.61
Lymphocytes (%)	77.62±4.62	82.10±1.38	75.84±4.17	79.80±4.82	78.70±6.12
Monocytes (%)	8.10±1.05	7.64±0.97	7.36±1.20	7.64±0.41	7.24±0.63
Neutrophils (%)	14.28±4.43	10.26±1.91	16.80±5.02	10.56±1.03	13.66±6.29
Females					
Hemoglobin (g/dL)	13.30±0.71	13.12±0.71	12.22±0.92	12.08±0.64	11.74±0.71 ^a
Hematocrit (%)	39.04±2.38	39.36±2.40	38.24±3.14	37.30±1.26	34.34±1.68 ^b
Erythrocytes (x10 ⁶ /mm ³)	7.97±0.47	8.07±0.55	7.87±0.74	7.75±0.33	7.90±0.63
Leucocytes (/mm ³)	4440.00±1372.00	4100.00±809.32	5140.00±1494.32	4440.00±1697.94	3660.00±709.22
Lymphocytes (%)	77.60±3.38	80.36±2.60	81.02±3.66	78.58±4.96	78.40±3.01
Monocytes (%)	9.56±0.42	9.72±2.22	9.34±1.47	8.92±1.71	8.62±1.02
Neutrophils (%)	12.84±3.57	9.52±3.37	9.64±2.50	10.50±3.12	12.14±3.13

Values are expressed as mean ± SD.

AAs=anacardic acids.

^a *p*<0.05 statistically significant from control.

^b *p*<0.05 statistically significant from control and cashew nut oil.

Table 7 – Subacute toxicity effects of anacardic acids on biochemical parameters in mice

Parameters	Control	Cashew nut oil	AAs 300 mg/kg	AAs 600 mg/kg	AAs 1000 mg/kg
Males					
ALT(U/L)	34 (23)	35 (10)	29 (9)	36 (16)	50 (53)
AST(U/L)	88 (81)	93 (52)	100 (30)	96 (37)	136 (141)
ALP(U/L)	170.40±25.68	147.80±19.77	151.60±13.55	138.80±5.71	169.80±29.78
Creatinine (mg/dL)	0.3 (0.2)	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.4 (0.1)	0.4 (0.2)
Urea (mg/dL)	72.00±8.74	77.80±13.04	63.60±8.56	76.40±7.60	96.60±35.66
Females					
ALT(U/L)	33 (10)	41 (42)	30 (46)	34 (34)	38 (7)
AST(U/L)	107 (71)	123 (444)	105 (291)	115 (199)	117 (58)
ALP(U/L)	161.60±8.41	162.00±12.10	169.80±22.46	155.20±16.17	157.00±12.47
Creatinine (mg/dL)	0.4 (0.1)	0.4 (0.2)	0.3 (0.1)	0.4 (0.1)	0.3 (0.1)
Urea (mg/dL)	48.60±3.91	56.80±14.41	62.20±11.34	61.20±8.78	80.20±8.10 ^{abc}

Values are expressed as mean ± SD or median (interquartile range).

AAs=anacardic acids.

^a $p < 0.001$ statistically significant from control.

^b $p < 0.05$ statistically significant from cashew nut oil.

^c $p < 0.05$ statistically significant from AAs 600mg/kg.

Table 8 – Frequency of micronucleated, immature erythrocytes 24 hours after acute treatment with anacardic acid in mice

Treatment	Mice (n ^o)	PCE (n ^o)	MNPCE (n ^o)	MN (%)
Control	7	7000	3	0.03
MNU	9	9000	40	0.4 ^a
Anacardic acids	6	6000	4	0.04
Cashew nut oil	8	8000	8	0.08

PCE= polychromatic erythrocytes. MN= frequencies of micronucleus. MNU= N-methyl-N-nitrosourea.

^a $p < 0.05$ statistically significant from the other groups.

Figure 1