UNIVERSIDADE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação genotóxica e antigenotóxica da curcumina contra a toxicidade
induzida pela cisplatina em culturas de células PC12

Leonardo Meneghin Mendonça

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação genotóxica e antigenotóxica da curcumina contra a toxicidade
induzida pela cisplatina em culturas de células PC12

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção de Título de Mestre em
Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Leonardo Meneghin Mendonça

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lusânia Maria Greggi
Antunes

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Mendonça, Leonardo Meneghin

Avaliação genotóxica e antigenotóxica da curcumina contra a toxicidade induzida pela cisplatina em culturas de células PC12. Ribeirão Preto, 2008.

101 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Antunes, Lusânia Maria Gregg

1. Curcumina. 2. Cisplatina. 3. Genotoxicidade. 4. Antigenotoxicidade. 5. Neurotoxicidade. 6. PC12.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leonardo Meneghin Mendonça

Avaliação genotóxica e antígenotóxica da curcumina contra a toxicidade induzida pela cisplatina em culturas de células PC12

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestre em
Toxicologia

Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lusânia Maria Gregg
Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico...

*... à **Deus**, que em toda sua infinita grandeza e generosidade me deu meios e tornou apto a conduzir e concluir este trabalho, aprendendo muito mais que pura e simplesmente como fazer ciência, me mostrando um pouco mais sobre a complexidade de nossa existência nos planos científicos e das relações humanas, e de alguma maneira me permitindo contribuir para aumentar o conhecimento humano.*

*... à minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Lusânia Maria Gregg Antunes** por ter aceitado o desafio de me orientar no mestrado, com todos os desafios que poderiam vir e que vieram, por ter trilhado os caminhos e me indicado as melhores direções, estando sempre prontamente disponível para ouvir e ajudar quando as dificuldades apareciam, por todo seu empenho e árduo trabalho nas tarefas que lhe eram cabíveis, por todos os inestimáveis ensinamentos proferidos ao longo dos anos de convivência, e ultrapassando os meios acadêmicos, pela ótima convivência e agradáveis momentos de descontração.*

*... especialmente a minha querida e amada família. Aos meus sobrinhos/afilhados **Gustavo e Maria Clara** por toda sua graça e felicidade que nos enche o coração, aos meus cunhados **Aninha e Dário**, pelos bons momentos compartilhados e por toda ajuda nunca negada, aos meus irmãos **Claudio** pelo companheirismo e amizade e **Márcia** por tudo que representa na minha vida, incentivo, apoio e entusiasmo, e principalmente aos meus pais, pela alma de minha mãe **Beatriz** que segue iluminando meus passos me mostrando o caminho certo, e ao meu pai **José Mendonça**, exemplo de hombridade e por toda confiança depositada em mim. A todos vocês eu dedico esta realização.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À **Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Pires Bianchi** por toda estrutura disponibilizada no laboratório de Bromatologia e Nutrigenômica, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP – USP, advinda de tantos anos de empenho como pesquisadora.

Ao **Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos** e a técnica especialista de laboratório **Dr^a. Neife Aparecida Guinain dos Santos**, pela disponibilidade do laboratório de toxicologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP – USP, e toda atenção dispensada no início de minha caminhada na pós-graduação, bem como pela doação da linhagem celular PC12.

Às técnicas **Joana D’Arc Castania Darin** e à **Dr^a. Regislaine Valéria Burin** pelo apoio técnico-científico prestado.

A todo o **corpo docente** do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

À secretaria de Pós-graduação, pelo ótimo atendimento e serviços prestados com excelente eficiência e qualidade.

À **Prof^a. Dr^a. Catarina Satie Takahashi** por ter gentilmente cedido o microscópio de epi-fluorescência no laboratório de Citogenética Molecular e Mutagênese do departamento de genética da FMRP-USP, possibilitando as análises do ensaio do cometa.

À **Dr^a. Gilmara Ausech Antonucci** pelos inestimáveis ensinamentos e treinamentos, estando aberta a dividir conhecimento sem nenhuma restrição, por todo agradável convívio diário estando sempre disposta a ajudar nos pequenos ou grandes problemas decorrentes das atividades de pesquisa.

À **Dr^a. Raquel Alves dos Santos**, pelos ensinamentos e treinamentos proferidos na técnica do cometa, bem como o pronto atendimento aos pedidos de auxílio nos momentos de dificuldade encontrados, colaborando de maneira importante na realização deste trabalho.

Aos colegas, técnicos e alunos de pós-graduação e iniciação científica do laboratório de Citogenética Molecular e Mutagenese do departamento de genética da FMRP-USP pelo agradável convívio nos momentos em que frequentei o laboratório.

Às minhas amigas e amigo do laboratório de Bromatologia e Nutrigenômica, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP – USP, **Cátia Lira do Amaral, Eliziani Mieko Konta, Estela Beatriz Behling, Graciela Cristina dos Santos, Joana D’Arc Castania Darin, Juliana Carvalho Ribeiro, Rafaela de Barros e Lima Bueno, Regislaine Valeria Burin, e Alexandre Ferro Aissa**, pelo ótimo convívio diário e momentos de descontração.

Aos meus professores da graduação em Farmácia-Bioquímica da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, pela ótima formação acadêmica, me tornando apto ao ingresso na pós-graduação.

À **Prof^a. Dr^a. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira**, pelo inestimável conhecimento repassado durante a graduação, e pelo grande incentivo em ingressar na pós-graduação em Toxicologia.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de auxílio financeiro, a todas as agências de fomento à pesquisa que contribuíram para a estruturação do laboratório de Bromatologia e Nutrição, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP – USP, bem como a própria FCFRP – USP.

RESUMO

MENDONÇA, L. M. **Avaliação genotóxica e antígeno-tóxica da curcumina contra a toxicidade induzida pela cisplatina em culturas de células PC12**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Pode-se dizer que o câncer, ao lado da AIDS, é a doença que atinge, a níveis mundiais, maior clamor da sociedade por desenvolvimento de cura e melhor qualidade de vida ao paciente. Várias terapias são utilizadas para o tratamento do câncer, podendo-se destacar a importância da quimioterapia em inúmeros protocolos de tratamento. Um dos fármacos mais antigos e mais utilizados na quimioterapia é a cisplatina, que ao longo dos seus mais de 30 anos na prática clínica demonstrou sua eficácia e foi incorporada no protocolo de tratamento de uma variedade de tumores. Entretanto, ao lado de sua comprovada eficácia, é inerente o desenvolvimento de vários efeitos colaterais resultante de sua toxicidade às células saudáveis. Neste trabalho, destaque é dado à neurotoxicidade, que surge em um grande número de pacientes que recebem tratamento com a cisplatina. Inúmeros esforços têm sido realizados na tentativa de prevenir ou controlar os efeitos tóxicos induzidos pela cisplatina, com atenção especial à suplementação do tratamento quimioterápico com compostos antioxidantes. Nesse sentido, este estudo visa avaliar a associação da curcumina, um composto polifenólico com notável atividade antioxidante e neuroprotetora, ao tratamento com cisplatina, em um modelo *in vitro* com culturas de células PC12. A curcumina é reconhecidamente um composto polifenólico com um amplo espectro de atividades biológicas, com suas propriedades neuroprotetoras demonstradas em vários modelos estudados estando principalmente relacionadas com seu potencial antioxidante. Os múltiplos mecanismos de ação dos compostos fenólicos e suas propriedades neuroprotetoras atribuídas à capacidade de inibição das espécies reativas de oxigênio indicam um potencial de inibição da neurotoxicidade que surge durante o tratamento quimioterápico com a cisplatina, visto a conhecida capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio da cisplatina. Como a geração de espécies reativas de oxigênio intracelular pode resultar em danos ao DNA pela ação direta das espécies reativas ou indiretamente via produtos de degradação da peroxidação lipídica, nosso estudo avaliou o potencial protetor da curcumina contra a genotoxicidade induzida pela cisplatina em culturas de células PC12, analisando a indução de micronúcleos e a análise de quebras de cadeia simples, cadeia dupla do DNA e sítios álcali-labeis pelo ensaio do cometa. Antes da avaliação antígeno-tóxica da curcumina, foi realizada uma avaliação citotóxica e genotóxica, em que pode-se observar que em concentrações elevadas a curcumina é citotóxica e genotóxica às células PC12. O efeito protetor da curcumina foi avaliado em pré-tratamento das culturas de células PC12 com concentrações não tóxicas. Nas três concentrações de curcumina estudadas não houve indícios de interferência com a citotoxicidade ou o efeito citostático da cisplatina. Embora o efeito protetor da curcumina contra os danos induzidos ao DNA de células PC12 não tenha sido evidente nos resultados obtidos pelo ensaio do cometa, a curcumina foi eficaz na redução de micronúcleos induzidos pela cisplatina, de maneira semelhante nas três concentrações avaliadas. Os resultados positivos obtidos nesse

estudo juntamente com os dados pré-existentes a respeito de efeitos protetores da curcumina incentivam novas pesquisas em relação aos possíveis benefícios da utilização da curcumina em terapia combinada aos quimioterápicos.

Palavras-chave: Curcumina. Cisplatina. Genotoxicidade. Antigenotoxicidade. Neurotoxicidade. PC12.

ABSTRACT

MENDONÇA, L. M. **Genotoxicity and antigenotoxicity evaluation of curcumin against induced toxicity of cisplatin in PC12 cells.** 2008. 101 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Several therapies are used for treating cancer and the importance of chemotherapy can be emphasized in many protocols of treatment. One of the oldest and most used drugs in chemotherapy is the cisplatin which, with its more than thirty years of clinical practice, has demonstrated its effectiveness being incorporated into the protocol of a variety of tumor treatments. On the other hand, it is intrinsic the development of various side effects resulting from its toxicity to healthy cells. This research gives emphasis to the neurotoxicity which appears in a large number of patients receiving the cisplatin treatment. Numerous efforts are being made in attempt to prevent or even control the toxic effects induced by cisplatin with special attention being given to the supplementation of chemotherapy treatment with antioxidant compounds. In that sense, this study aims to assess the association of curcumin, a polifenolic compound with remarkable antioxidant and neuroprotective activity, to the cisplatin treatment in an *in vitro* neuronal model with PC12 cell cultures. The curcumin is admittedly a polifenolic compound with a broad spectrum of biological activities and their neuroprotective properties, demonstrated in several models, are strongly related to its antioxidant potential. The multiple mechanisms of action of the phenolic compounds and their neuroprotective properties credited to the ability of inhibition of the reactive oxygen species indicate a potential inhibition of neurotoxicity that takes place during the chemotherapy treatment with cisplatin, given its well known ability to generate reactive oxygen species. Since the generation of reactive oxygen species intracellular can result in DNA damage by direct action of reactive species or indirect, through degradation products of the lipid peroxidation, our studies evaluated the potential protector of curcumin against the genotoxicity induced by cisplatin in PC12 cell cultures by examining the induction of micronuclei and analyzing DNA single strand breaks, double strand breaks, and alkali-labeled sites through the comet test. Before the antigenotoxic evaluation of the curcumin, a cytotoxic and genotoxic test was conducted where it was observed that when in high concentrations the curcumin is cytotoxic and genotoxic to the PC12 cells. The protective effect of curcumin was evaluated at the pre-treatment of PC12 cell cultures with non-toxic levels of concentration. In the three studied curcumin concentrations there was no evidence of interference with the cytotoxicity or cytostatic effect of the cisplatin. Although the protective effect of the curcumin put against the damage caused to the DNA of cells PC12 was not evident in the results obtained by the comet test, the curcumin was equally effective in the reduction of micronuclei induced by the cisplatin in all three concentrations evaluated. The positive results obtained in this study combined with the pre-existing data about the protective effects of the curcumin encourage some more new research on possible benefits of using curcumin in combination to chemotherapy.

Keywords: Curcumin. Cisplatin. Genotoxicity. Antigenotoxicity. Neurotoxicity. PC12.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer no Brasil por 100 mil homens ou mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação (exceto pele não melanoma)	3
Figura 2. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil para o ano de 2008 (exceto pele não melanoma)	4
Figura 3. Formação e efeito dos aductos da cDDP. O átomo de platina da cDDP se liga covalentemente a posição N ⁷ das purinas. Os aductos DNA-cDDP causam várias respostas celulares como: inibição da replicação celular, inibição de transcrição, parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose	5
Figura 4. Estrutura química da curcumina, com tautomerismo ceto-enólico.	11

LISTA DE SIGLAS

% DNA	Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides
% BN	Porcentagem de células binucleadas
A549	linhagem celular de câncer de pulmão
AP-1	Ativador de proteína-1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	Citrato de sódio
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CBN	Células binucleadas
cDDP	Cisplatina
CGC	Células granuladas do cerebelo
CHO	linhagem celular de ovário de hamster chinês
Cit-B	Citocalasina-B
CMN	Curcumina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DRG	Neurônios do gânglio da raiz dorsal
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HCT116	linhagem celular de câncer colorectal
HepG2	linhagem celular de hepatoma humano
HFOb 1.19	Linhagem celular de osteoblastos humanos
IC _x	Concentração que inibe o crescimento das células em x%
INCA	Instituto nacional do cancer
IPBC	Índice de proliferação do bloqueio da citocinese
KH ₂ PO	Fosfato monopotássico

MG-63	linhagem celular de osteosarcoma
MN	micronúcleo
MNs	micronúcleos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo
$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$	bomba de sódio-potássio
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxico de sódio
$\text{NF}\kappa\text{B}$	fator nuclear kappa B
OM	<i>Olive moment</i>
PC12	Linhagem celular obtida de feocromocitoma de rato
pH	potencial hidrogenionico
RNA	Ácido ribonucléico
SH-SY5Y	células de neuroblastoma humano
TBA	ácido tiobarbitúrico
TM	<i>Tail moment</i>
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
H	Hidrogênio

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
μL	microlitros
$\pm$	Mais ou menos
®	Marca registrada
cm	centímetros
cm^2	centímetros quadrados
g	gravidade
M	Molar
m^2	metro quadrado
mg	miligrama
mL	mililitros
mM	milimolar
nm	nanômetros
°C	Graus Celsius
™	Marca comercial
V	volts
β	Beta
μg	microgramas

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	Erro! Indicador não definido.
LISTA DE SIGLAS.....	v
LISTA DE SÍMBOLOS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Visão geral do câncer e principais terapias	2
1.2. Cisplatina	4
1.2.1. Mecanismo de ação	4
1.2.2. Cisplatina e a neurotoxicidade	6
1.3. Antioxidantes e suas propriedades terapêuticas	7
1.4. Associação de antioxidantes à quimioterapia	9
1.5. Curcumina	10
1.6. Ensaio de genotoxicidade	13
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos	19
6. CONCLUSÕES	20
7. REFERÊNCIAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Visão geral do câncer e principais terapias

Em pesquisa realizada pela Organização Mundial da Saúde, o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo, sendo responsável pela morte de 7,6 milhões de pessoas no ano de 2005, 13% de todas as mortes ocorridas neste ano no mundo. Atualmente, é a segunda causa de mortes por doença no Brasil, com uma estimativa de 466.730 novos casos de câncer para o ano de 2008, distribuídos heterogeneamente no território nacional (Figuras 1 e 2) (INCA, 2008).

Existem quatro principais tipos de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia, quimioterapia e a terapia biológica. Recentemente, também tem sido utilizada a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos, sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, nos quais são associadas várias estratégias de tratamento (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2008).

Em aproximadamente dois terços dos pacientes, a neoplasia se caracteriza por micrometástases, fazendo-se necessário uma abordagem sistêmica, o que acontece na maioria dos casos com o tratamento quimioterápico. O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células cancerosas, preservando as normais. Assim, na quimioterapia é desejável o uso das mais altas doses toleráveis para atingir o maior número de morte celular possível, entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais, o que resulta na maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2008).

Um grande número de compostos são utilizados na quimioterapia oncológica, sendo que a maioria deles tem na interação com o DNA seu mecanismo de ação, como os análogos das bases nitrogenadas, agentes intercalantes e os agentes alquilantes. Devido a ampla utilização clínica desses quimioterápicos, há um grande interesse científico no sentido do desenvolvimento de novos análogos mais eficazes e menos

tóxicos, bem como desenvolvimento de mecanismos de citoproteção aumentando a seletividade e eficiência desses agentes (ALMEIDA et al., 2005).

Figura 1. Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer no Brasil por 100 mil homens ou mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação (exceto pele não melanoma) (INCA, 2008).

Figura 2. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil para o ano de 2008 (exceto pele não melanoma) (INCA, 2008).

1.2. Cisplatina

1.2.1. Mecanismo de ação

A Cisplatina (cDDP) é um fármaco antineoplásico alquilante muito empregado no tratamento do câncer, principalmente cânceres de ovário e próstata, bem como nos tratamentos de câncer de esôfago, carcinoma de bexiga, mama, cabeça, pescoço e pulmão (BODO et al., 2005; BRABEC; KASPAROVA, 2005; CHANEY et al., 2004; KARTALOU; ESSIGMANN, 2001; WANG; LIPPARD, 2005).

A cDDP é um fármaco que possui um átomo central de platina envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia. Torna-se ativada dentro da célula por substituição dos íons cloreto pela água, e esta forma é muito reativa nos centros nucleofílicos de biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e membranas fosfolipídicas (CHO et al., 2008; JAMIESON; LIPPARD, 1999; WANG; LIPPARD, 2005).

A atividade biológica dos compostos de platina foi inicialmente observada por Rosenberg na década de 60, em estudos do efeito de campos elétricos sobre o crescimento bacteriano. Nesses estudos, as bactérias *Escherichia coli* submetidas a um campo elétrico, proveniente de eletrodos de platina imersos no meio de cultura, tinham sua divisão celular inibida e apresentavam um crescimento filamentosos. Esse efeito foi posteriormente atribuído a presença de um produto da eletrólise dos eletrodos de platina, identificado como sendo a cis-diclorodiaminoplatina. Alguns anos após foram testados complexos de platina em modelos animais com tumor, com resultados promissores, o que levou ao início de experimentos em humanos (ROSENBERG, 1985).

O efeito antineoplásico da cDDP se deve a sua interação com o DNA, onde a cisplatina se liga a posição N⁷ das purinas (Figura 3), formando aductos que vão se transformar em *cross-links* (ligações cruzadas) inter e intracadeia predominantemente GpG e ApG, os quais são responsáveis pela citotoxicidade e mutagenicidade da cisplatina. Os aductos formados interferem com a duplicação do DNA pelo bloqueio da enzima DNA polimerase e também podem inibir a transcrição, resultando em bloqueio do ciclo celular e apoptose (NADIN et al., 2005; WOZNIAK et al., 2004).

Figura 3. Formação e efeito dos aductos da cDDP. O átomo de platina da cDDP se liga covalentemente a posição N⁷ das purinas. Os aductos DNA-cDDP causam várias respostas celulares como: inibição da replicação celular, inibição de transcrição, parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (adaptado de WANG; LIPPARD, 2005).

1.2.2. Cisplatina e a neurotoxicidade

Vários fármacos empregados nos tratamentos quimioterápicos têm seu uso limitado devido ao desenvolvimento de efeitos colaterais, este problema é particularmente importante no tratamento com compostos de platina, sendo freqüentemente o fator limitante das doses empregadas (KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007). O uso da cDDP na prática clínica é limitado devido aos seus efeitos adversos como nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, mielossupressão, efeitos grastintestinais e mutagênese (WEIJL et al., 1997).

Os principais efeitos colaterais dose limitante da cDDP são a nefrotoxicidade e a neurotoxicidade, entretanto a toxicidade renal induzida nos tratamentos com cDDP tem sido reduzida com o artifício da hiperhidratação, assim a neurotoxicidade remanesce como principal efeito adverso no tratamento quimioterápico com a cDDP (PACE et al., 2003).

Os efeitos neurotóxicos que surgem com o tratamento com cDDP se manifestam como uma neuropatia periférica, podendo ser graves e afetar significativamente a qualidade de vida do paciente. A neuropatia periférica é definida como uma disfunção dos neurônios periféricos, motores, sensoriais e autonômicos, resultando em sintomas de parestesia, disestesia, hipoestesia, hiperestesia, perda de propriocepção, perda da discriminação de toque e temperatura, areflexia, e dor e/ou fraqueza motora. Mesmo embora na maioria dos casos haja uma reversão desse quadro, essa reversão é lenta e incompleta podendo afetar a qualidade de vida e as funções normais do paciente por vários anos após o término do tratamento (KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007; WILKES, 2007).

Cerca de 20% dos pacientes são incapazes de completar o ciclo integral da terapia com a cDDP devido à neuropatia periférica, que se manifesta logo após o primeiro ciclo de quimioterapia. Esta neuropatia é dose limitante e estreitamente relacionada com a dose total acumulada do fármaco, sendo que uma neurotoxicidade significativa é encontrada na maioria dos pacientes adultos que receberam uma dose de cDDP entre 400 e 500 mg/m² (THOMPSON et al., 1984). Esta condição é predominantemente sensorial, com queixas inicialmente de parestesia nas

extremidades distais, que pode progredir para grave ataxia sensorial. Esta neuropatia pode continuar a progredir por vários meses após o término do tratamento com a cDDP (GILL; WINDEBANK, 1998).

As investigações sobre a neurotoxicidade provocada pelo tratamento com a cDDP têm sido limitadas. O desenvolvimento de modelos animais para o estudo da neurotoxicidade da cDDP tem sido dificultado porque o desenvolvimento de grave nefrotoxicidade precede a neurotoxicidade. Os mecanismos da neurotoxicidade induzida pela cDDP ainda não estão completamente esclarecidos, mas foi observada a indução de aductos em células da linhagem PC12 e de apoptose nos neurônios dos gânglios das raízes dorsais de roedores (McDONALD et al., 2005).

1.3. Antioxidantes e suas propriedades terapêuticas

Os compostos fenólicos ou os polifenóis constituem um dos mais numerosos e amplamente distribuídos grupos de metabólitos secundários de plantas. Os polifenóis ocorrem naturalmente e são encontrados em quantidades significativas em vegetais, frutas e bebidas, constituindo uma parcela importante da dieta (SOOBRAATTEE et al., 2005).

Os polifenóis encontrados em plantas são conhecidos como agentes multifuncionais, pois apresentam uma ampla variedade de efeitos biológicos, incluindo antibacteriano, antiinflamatório, antiviral, anticarcinogênico e antimutagênico, sendo muitas das suas propriedades atribuídas ao seu potencial antioxidante, cuja eficiência pode superar a capacidade antioxidante das vitaminas C e E (ANTUNES et al., 2000; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

Durante as últimas décadas, os estudos epidemiológicos têm consistentemente mostrado uma associação inversa entre o consumo de vegetais e frutas e o desenvolvimento de uma grande variedade de condições patofisiológicas, relacionadas com a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo doenças neurodegenerativas, câncer, diabetes, doenças inflamatórias e envelhecimento. Estas espécies reativas de oxigênio podem ser altamente prejudiciais ao organismo, pois elas atacam as macromoléculas biológicas, tais como os lipídeos, as proteínas e o DNA,

induzindo oxidação e provocando danos nas membranas, inativação de enzimas e danos no DNA (HALLIWELL, 2001). Embora os efeitos protetores da dieta tenham sido primariamente atribuídos aos antioxidantes já reconhecidos, tais como as vitaminas C, E e o β -caroteno, os compostos fenólicos encontrados nas frutas, chás e vinhos também apresentam um potencial antioxidante significativo (ARUOMA, 2003).

As propriedades terapêuticas dos compostos fenólicos foram atribuídas principalmente a sua atuação como agentes antioxidantes, agentes redutores, doadores de hidrogênio, seqüestradores do oxigênio singlete, quelante de metais e a capacidade de modificar a atividade de enzimas antioxidantes, tais como a catalase (PAVLIKA; GEBHARDT, 2005; SOOBRATTEE et al. 2005). Estudos têm demonstrado que compostos fenólicos da dieta podem estimular o sistema de defesa de detoxificação, pela modulação da transcrição dos elementos responsivos antioxidantes (MASELLA et al., 2005).

Os estudos epidemiológicos também têm revelado os efeitos benéficos da dieta com alto consumo de compostos fenólicos antioxidantes contra o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, mostrando que os fenólicos podem proteger o cérebro pela sua capacidade de modulação dos sinais intracelulares e promoção da sobrevivência celular (DAJAS et al., 2003a). O mecanismo de seqüestro das espécies reativas de oxigênio é uma das muitas ações dos antioxidantes que é necessária para restabelecer o equilíbrio oxidativo perdido em várias condições patológicas. Desta forma, Dajas et al. (2003b) propuseram que a capacidade de proteção dada por um determinado composto fenólico antioxidante poderia ser um ponto crítico na abordagem de novas terapias neuroprotetoras.

Os mecanismos celulares que levam a perda primária de neurônios nas doenças neurodegenerativas ainda não foram completamente esclarecidos, mas não há dúvidas sobre a prevalência dos danos oxidativos nas doenças de Parkinson, Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica, cujas desordens são associadas com o aumento da peroxidação lipídica, mudanças no sistema de defesa antioxidante, depleção nos níveis de glutathione e alterações nas atividades das enzimas antioxidantes (DEIANA et al., 2004; WANG et al., 2003). A identificação dos caminhos bioquímicos envolvidos na morte da célula neuronal devido ao estresse oxidativo poderia contribuir para o

desenvolvimento de fármacos ou alimentos funcionais para o tratamento das várias desordens neurodegenerativas, mas a sua eficiência como antioxidante e ausência de citotoxicidade e mutagenicidade deveriam ser investigadas antes da possível aplicação clínica (COLOGNATO et al., 2006; ZBARSKY et al., 2005).

Contudo, até o momento, pouco é conhecido sobre os efeitos dos compostos fenólicos antioxidantes sobre as células neuronais. A linhagem celular PC12, obtida de feocromocitoma de rato, pode fornecer um bom sistema modelo para a investigação de indução de danos oxidativos nos neurônios (PAVLICA; GEBHARDT, 2005).

1.4. Associação de antioxidantes à quimioterapia

Várias estratégias têm sido estudadas na tentativa de prevenir ou controlar os efeitos adversos que surgem com o tratamento quimioterápico com ou sem a intervenção de substâncias com atividade farmacológica (WILKES, 2007).

Especificamente quanto às neuropatias induzidas na quimioterapia, vários compostos têm sido avaliados quanto a capacidade de bloquear ou reverter esses efeitos, incluindo o ácido docohexanóico ou fatores neurotróficos e de neuroproteção, como o fator de crescimento nervoso, eritropoetina e fator inibidor da leucemia, que apresentaram resultados positivos em variados modelos experimentais, porém seu uso na prática clínica é limitado devido a dificuldades na administração, problemas com estabilidade, surgimento de efeitos adversos ou ausência de eficácia em estudos clínicos (KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007).

Antioxidantes como glutathione, melatonina e a vitamina E, também apresentaram efeitos positivos na proteção contra a neuropatia induzida pela quimioterapia em estudos preliminares, entretanto, até o momento não foi identificado qualquer composto capaz de prevenir ou reverter estas neuropatias de maneira eficaz (KLEIN; BROWN; TURNLEY, 2007).

No caso da quimioterapia, é preciso determinar se a geração das espécies reativas de oxigênio produzidas pelos agentes antitumorais ou seus metabólitos intermediários reativos têm um papel na citotoxicidade sobre a célula tumoral. Se a indução dos radicais livres de oxigênio é importante para a atividade do fármaco, os

antioxidantes poderiam interferir com a eficiência do antitumoral. Entretanto, se as espécies reativas de oxigênio são responsáveis somente pelos efeitos adversos do antitumoral, o emprego de antioxidantes da dieta poderia reduzir ou inibir a gravidade de tais efeitos sem interferência com a atividade do quimioterápico (CONKLIN, 2004).

A inserção de antioxidantes na terapêutica antineoplásica com complexos de platina parece não interferir na eficácia do tratamento, sugerindo que a produção de radicais livres não é o principal mecanismo responsável pela atividade do antitumoral ou seu efeito tóxico sobre as células tumorais (CONKLIN, 2004). Em busca de uma alternativa viável para o tratamento adjuvante com a cDDP, a curcumina (CMN) é mais uma opção a ser avaliada, uma vez que os compostos fenólicos têm mostrado atividade neuroprotetora em vários experimentos e modelos estudados, tal atividade poderia ser estendida aos efeitos neurotóxicos desenvolvidos durante o tratamento quimioterápico com a cDDP.

1.5. Curcumina

Recentemente, um grande número de plantas e seus compostos, como os flavonóides e os polifenóis, tem recebido atenção por apresentarem efeitos biológicos específicos. Dentre esses vários compostos a curcumina tem emergido como um agente com múltiplas propriedades biológicas.

O pó do rizoma obtido da planta *Curcuma longa* Linn., denominado cúrcuma ou turmerico, tem sido usado na Ásia como planta medicinal há mais de 2000 anos e a sua utilização é referida na antiga escritura Hindu. Em adição às suas propriedades aromáticas, estimulantes e corantes na dieta, a cúrcuma tem sido usada no tratamento de inflamações e tumores. A *Curcuma* ssp. contém uma variedade de curcuminóides e muitos dos seus efeitos biológicos são atribuídos à presença da curcumina (MAHESHWARI et al., 2006).

A curcumina é um fenólico de baixo peso molecular, caracterizado quimicamente em 1910, constituindo de 2 a 8% da maioria das preparações de cúrcuma. Estruturalmente a curcumina exibe um tautomerismo ceto-enólico (Figura 4), com predominância da forma ceto em pH de 3 a 7, possuindo uma estrutura β -dicetona,

atuando como potente doador de H. Em pH acima de 8 a forma enólica da curcumina predomina, atuando como doador de elétrons, assim como a maioria dos antioxidantes fenólicos sequestrantes (EIGNER; SHOLZ, 1999; SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005).

Figura 4. Estrutura química da curcumina, com tautomerismo ceto-enólico (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005).

Este fenólico tem sido reconhecido como um antioxidante natural com atividade antitumoral e antimutagênica, inibidor do metabolismo do ácido araquidônico, capaz de induzir apoptose e alterar a expressão gênica, inibir a atividade de importantes fatores de transcrição como NFκB e AP-1, e é um eficiente agente antiinflamatório. Atualmente está sendo avaliado como um possível agente quimiopreventivo pelo Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos (KIM; PARK; KIM, 2001; SINGH; KHAR, 2006).

Também foi demonstrado que a curcumina possui propriedades neuroprotetoras e anti-envelhecimento. Em um estudo com ratos, foram avaliados parâmetros relacionados com o envelhecimento como: peroxidação lipídica, concentração de lipofuscina e acúmulo intraneuronal de lipofuscina, atividades das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e a Na⁺/K⁺-ATPase, em diferentes regiões do cérebro.

O tratamento crônico com curcumina resultou na diminuição da peroxidação lipídica e diminuição do acúmulo de lipofuscina, e um aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e Na^+/K^+ -ATPase, demonstrando seu potencial neuroprotetor (BALA; TRIPATHY; SHARMA, 2006).

Os extratos alcoólicos isolados de curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina, isolados da cúrcuma, apresentaram efeito protetor em células da linhagem PC12 e células do endotélio da veia umbilical humana expostas ao estresse oxidativo gerado pela β -amilóide. A β -amilóide pode levar a perda de neurônios e atrofia cerebral, reconhecidas como uma das principais causas da Doença de Alzheimer (KIM; PARK; KIM, 2001). A administração de curcumina em ratos atenuou significativamente a perda de neurônios no sistema nervoso e este efeito neuroprotetor foi relacionado com o seu potencial antioxidante (ZBARSKY et al., 2005). A capacidade neuroprotetora de outros compostos fenólicos, tais como quercetina, luteolina e miricitina também foi observada por meio do aumento da sobrevivência de células PC12 submetidas ao tratamento com peróxido de hidrogênio (DAJAS et al., 2003a).

Estudos realizados em roedores mostram que a curcumina administrada via oral possui baixa biodisponibilidade, mesma conclusão sendo obtida em estudos clínicos. Entretanto, estratégias podem ser adotadas possibilitando o aumento da biodisponibilidade deste interessante composto polifenólico, utilizando formulações alternativas como as nanopartículas, micelas ou os lipossomas. Outra promissora estratégia para aumentar a biodisponibilidade da curcumina é a administração de adjuvantes como a piperina, que em administração concomitante com a curcumina aumentou a biodisponibilidade da curcumina em humanos em 2000% (ANAND et al., 2007; SHOBA et al., 1998).

Mesmo em compostos derivados de produtos naturais encontrados na dieta, como a curcumina, existe o consenso da necessidade da avaliação da segurança quando há o interesse de seu uso em formulações farmacêuticas, que freqüentemente são administradas em concentrações que excedem as encontradas na dieta. Ganiger et al. (2007), realizaram um estudo sobre a toxicidade da curcumina em ratos Wistar em duas gerações sucessivas, com informações relevantes quanto à avaliação do risco à saúde. Foi observado que a aparência, comportamento e atividade reprodutiva dos

ratos dos grupos tratados com curcumina foram normais. Em alguns estudos clínicos foi observado que a administração oral de curcumina foi relacionada com algum efeito adverso, porém na maioria dos estudos clínicos a administração oral de curcumina não resultou em qualquer efeito tóxico observável (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005).

1.6. Ensaio de genotoxicidade

Os testes da genética toxicológica são componentes básicos da avaliação de segurança pré-clínica de novas substâncias candidatas a fármacos, os quais têm o propósito de identificar compostos que possuem risco potencial de carcinogenicidade e mutagenicidade. Os testes de genotoxicidade são comumente conduzidos nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos candidatos à fármacos por serem comparativamente de menor duração, relativamente de baixo custo e fornecendo informações sobre substâncias potencialmente carcinogênicas nos estágios iniciais do desenvolvimento dos novos fármacos (WITTE et al., 2007).

Embora nossa compreensão sobre a estrutura cromossômica seja incompleta, evidências sugerem que anormalidades cromossômicas sejam consequência direta e manifestação de danos ao nível do DNA. Nas técnicas clássicas da citogenética, os cromossomos são estudados diretamente pela observação e quantificação de aberrações em metáfases. Assim, a citogenética clássica fornece informações detalhadas nas análises, porém a complexidade e o dispendioso trabalho laboratorial enumerando as aberrações nas metáfases e o efeito dos artefatos da técnica estimularam o desenvolvimento de métodos mais simples para determinação dos danos cromossômicos (FENECH, 2000).

Uma alternativa mais simples às técnicas da citogenética clássica foi proposta independentemente por Schmid (1975) e Heddle (1973) avaliando os danos cromossômicos pela quantificação de micronúcleos (MNs). O ensaio do micronúcleo (MN) em eritrócitos da medula óssea e do sangue periférico é um dos mais eficientes testes citogenéticos na área de toxicológica genética (FENECH, 2000). Atualmente esta técnica tem sido desenvolvida para a avaliação de micronúcleos em diversos tipos

celulares, e vários trabalhos já apresentam resultados nesse sentido (CAO et al., 2007; LIU et al., 2007; ROSA et al., 2007). Entretanto, a análise de micronúcleos em células PC12 ainda não apresenta relatos na literatura.

O teste do MN *in vitro* é de especial interesse na composição da bateria de testes de genotoxicidade devido a simplicidade na quantificação dos MNs e a sua aplicabilidade em vários tipos celulares. Os MNs são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células-filhas. Os MNs originam-se de fragmentos cromossômicos, resultantes de lesões/aductos ao nível do DNA ou cromossomos (efeito clastogênico), ou cromossomos inteiros que não se ligaram às fibras do fuso e não foram incluídos nos núcleos filhos principais durante a divisão nuclear, em consequência de lesões ao nível de proteínas envolvidas na segregação cromossômica, ou seja, por uma disfunção do aparato mitótico (efeito aneugênico). Assim, a quantificação de MNs é um valioso índice de quebras e/ou perdas cromossômicas (ALBERTINI *et al.*, 2000; FENECH, 2000; FENECH *et al.*, 1999; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

Os MNs são expressos em células que completaram a divisão nuclear, portanto, idealmente os MNs devem ser quantificados no estágio binucleado do ciclo celular, assim sendo, se faz importante identificar as células que completaram uma divisão nuclear, e o método de escolha para tal em ensaios de MNs *in vitro* é o bloqueio da citocinese. Nesse método o bloqueio da citocinese acontece pela citocalasina B (Cit-B), e as células que completaram uma divisão nuclear podem ser identificadas pela sua aparência binucleada, e assim, as culturas submetidas ao ensaio de MNs com bloqueio da citocinese devem obter quantidade de células binucleadas (CBN) acima de 35%. Este método foi inicialmente desenvolvido para culturas de células de linfócitos humanos, mas tem sido adaptado para aplicação em vários tipos celulares (FENECH, 2000).

Adicionalmente o ensaio de MNs com bloqueio da citocinese permite a avaliação de toxicidade celular ou atraso no ciclo celular por meio da determinação da proliferação celular nas culturas, utilizando o índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) proposto por Surrallés et al. (1995).

Outro teste promissor na área da genética toxicológica que tem sido amplamente utilizado é o ensaio do cometa (eletroforese em gel de célula única). Os motivos pelos quais o ensaio do cometa tem recebido atenção recentemente incluem a possibilidade de automação de vários estágios do protocolo experimental e a pequena quantidade de amostra necessária para a realização do teste (HARTMANN et al., 2001; WITTE et al., 2007).

O ensaio do cometa pode ser utilizado para estudos *in vivo* bem como para estudos *in vitro*, possuindo várias aplicações na identificação do risco potencial de agentes químicos e físicos. Este método foi inicialmente desenvolvido por Singh et al., 1988, e desde então, têm sido objeto de estudo de várias pesquisas na validação do método bem como na diversificação de sua aplicabilidade. Existem vários artigos revisando os procedimentos do ensaio do cometa e seu uso na genética toxicológica, porém, atualmente, o procedimento geral mais comumente utilizado segue o de Tice et al., (2000). Resumidamente o ensaio do cometa se baseia na avaliação da migração do DNA em um gel de agarose sob condições de eletroforese. Quando visto pelo microscópio a célula, agora chamada de nucleóide por ter sido removido o material extra nuclear, tem a aparência de um cometa, com a cabeça (região nuclear) e a cauda contendo as fitas ou fragmentos de DNA (WITTE et al., 2007).

O ensaio do cometa envolve a lise das células gerando os nucleóides compostos de DNA nuclear. Os nucleóides são submetidos a uma eletroforese que causa a migração do DNA danificado para fora do núcleo em direção ao ânodo formando o cometa, que contém a cabeça o DNA que não foi danificado, e a cauda contendo a porção de DNA que sofreu danos. Desse modo, as células com maior dano ao DNA apresentam maior quantidade de DNA na cauda. (ALMEIDA et al., 2006).

Dentre as várias versões do ensaio do cometa, a versão alcalina possui a capacidade de detectar o mais amplo espectro de danos ao DNA. Na versão alcalina um aumento na migração do DNA é proveniente de um aumento nos níveis de danos ao DNA de quebras de fita dupla, fita simples e sítios álcali lábeis (TICE et al., 2000). Adicionalmente, um aumento na migração do DNA pode ser relacionado com a presença de quebras de fita simples associadas com sítios de reparo por excisão incompletas, assim, o reparo do DNA por excisão pode influenciar o ensaio do cometa

de maneira complexa dependendo do tipo de lesão primária no DNA e do tempo da análise (COLLINS et al., 1993). Sob certas condições o ensaio do cometa também pode detectar ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína, que na ausência de outros tipos de lesões ao DNA resultam em uma relativa diminuição na migração do DNA comparado com os controles, devido a capacidade das ligações cruzadas de estabilizar a molécula de DNA (WITTE et al., 2007).

Uma das maiores vantagens do ensaio do cometa sobre os métodos de citogenética é que a proliferação celular não é necessária para a avaliação do potencial genotóxico, e assim qualquer célula pode ser utilizada no ensaio. Outra vantagem do ensaio do cometa se refere a citotoxicidade dos agentes testados. Em geral, mecanismos indiretos que levam a citotoxicidade podem levar a formação de quebras do DNA, entretanto como os danos ao DNA no ensaio do cometa são analisados individualmente nos nucleóides, células mortas ou em processo de morte celular podem ser identificadas pelas suas imagens específicas, que resultam em nucleóides com cabeças pequenas ou não existentes e caudas largas e difusas (OLIVE; FRAZER; BANATH, 1993). Entretanto, para excluir potenciais falso positivos influenciados pela citotoxicidade é recomendado a realização de um ensaio prévio de citotoxicidade pela avaliação da viabilidade celular, utilizando corantes como o azul de tripan (TICE et al., 2000).

A experiência da genética toxicológica nas décadas passadas demonstrou a necessidade de se associar mais de um método para detectar os vários possíveis efeitos genotóxicos das substâncias testadas (WITTE et al., 2007).

Embora, em geral, o ensaio do cometa possa ser considerado mais sensível na avaliação de danos ao DNA por agentes genotóxicos que o ensaio do MN, deve-se levar em consideração os diferentes mecanismos envolvidos quando resultados positivos são observados. Essencialmente, o ensaio de MNs detecta lesões que sobreviveram pelo menos um ciclo celular, e o ensaio do cometa lesões ao DNA reparáveis ou sítios álcali-labeis (GOETHEM; LISON; KIRSCH-VOLDERS, 1997).

Dependendo do estágio do ciclo celular, da capacidade de reparo, das características genéticas gerais da célula e do agente analisado, apenas uma fração dos danos induzidos ao DNA vão se transformar em mutações (GOETHEM; LISON;

KIRSCH-VOLDERS, 1997). Assim, por razões mecanísticas, se faz interessante investigar a correlação entre a extensão das quebras de DNA quantificadas no ensaio do cometa e a frequência de MNs nas mesmas condições experimentais, possibilitando a estimativa da quantidade de quebras de DNA convertidas em mutações genômicas ou cromossômicas, contribuindo para a compreensão da mutagenicidade dos agentes testados (GOETHEM; LISON; KIRSCH-VOLDERS, 1997).

Como os resultados obtidos nos ensaio de MNs e do cometa *in vitro* se correlacionam de maneira satisfatória com a frequência de aberrações cromossômicas induzidas pela substância teste no mesmo sistema celular, a utilização dos testes do MN e cometa em combinação é um artifício muito útil na avaliação de genotoxicidade e na investigação dos possíveis mecanismos de danos ao DNA induzidos pelas substâncias teste (GOETHEM; LISON; KIRSCH-VOLDERS, 1997).

Estudos mostram que a cDDP além da formação de ligações cruzadas com o DNA, altera o balanço oxidativo da célula, inibe certas enzimas, entre elas a glutatona, resultando na diminuição da capacidade antioxidante da célula e conseqüente aumento de espécies reativas de oxigênio intracelular (SHEIKH-HAMAD, 2008). A geração de espécies reativas de oxigênio intracelular pode resultar em danos ao DNA pela ação direta das espécies reativas ou indiretamente via produtos de degradação da peroxidação lipídica, estando relacionada com os efeitos adversos da cDDP. Assim, nosso estudo busca avaliar a capacidade protetora da curcumina contra os danos genotóxicos provenientes do aumento de espécies reativas de oxigênio intracelular provocado pela cDDP sem interferir na sua atividade antineoplásica.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar o possível efeito protetor de diferentes concentrações do fenólico curcumina sobre a genotoxicidade induzida pelo antitumoral cDDP em células PC12 *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar se o tratamento com a curcumina isolada, em diferentes concentrações, induz citotoxicidade ou genotoxicidade em células PC12 em cultura;
- Avaliar a influência da curcumina sobre a atividade citostática da cDDP;
- Avaliar o potencial efeito protetor da curcumina pela capacidade de reduzir a indução de MNs pela cDDP em células PC12;
- Avaliar o potencial efeito protetor da curcumina pela capacidade de reduzir os danos causados pela cDDP no DNA de células PC12, determinado pela frequência de quebras de cadeias simples, cadeias duplas e sítios álcali lábeis.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Levando-se em consideração o objetivo principal deste estudo, de avaliar o possível efeito protetor da curcumina sobre os danos induzidos pela cDDP ao DNA de células PC12 foi possível chegar as seguintes conclusões:

- As células PC12 são sensíveis à citotoxicidade e genotoxicidade da cDDP;
- Concentrações elevadas de curcumina são citotóxicas e genotóxicas em células PC12;
- A curcumina em baixas concentrações (1,0; 2,5 e 5,0 µg/mL) não é citotóxica nem genotóxica em células PC12;
- O pré-tratamento com curcumina, nas concentrações testadas, não interferiu na atividade citotóxica ou citostática da cDDP nas células PC12;
- Embora no ensaio do cometa tenha havido um indicativo do efeito protetor da curcumina contra danos induzidos pela cDDP ao DNA de células PC12, este efeito não pode ser confirmado devido às diferenças entre os grupos não serem estatisticamente significativas e da interferência do solvente DMSO.
- A curcumina possui efeito protetor contra danos induzidos pela cDDP ao DNA de células PC12, demonstrados pela capacidade do pré-tratamento com curcumina de reduzir eficientemente a indução de micronúcleos pela cDDP;
- O efeito protetor da curcumina observado não apresentou relação dose-efeito.

De acordo com as conclusões realizadas neste estudo e a extensa literatura a respeito da atividade biológica da curcumina, pode-se afirmar que a curcumina é um composto com grande potencial terapêutico em futuras estratégias de prevenção na clínica.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS*

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALMEIDA, G.M.; DUARTE, T.L.; STEWARD, W.P.; JONES, G.D. Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro and in cancer patients using the alkaline comet assay. **DNA repair**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 219-225, 2006.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A.B.; NEWMAN, R.A.; AGGARWAL, B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.

ANTUNES, L.M.; TAKAHASHI, C.S. Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, New York, v. 19, n. 1, p. 53-59, 1999.

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P.; DARIN, J.D.C.; BIANCHI, M.L.P. Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 465, n. 102, p. 131-137, 2000.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P.; DIAS, F.L.; TAKAHASHI, C.S. Modulatory effects of curcumin on the chromosomal damage induced by doxorubicin in Chinese hamster ovary cells. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, New York, v. 19, n. 1, p. 1-8, 1999.

ANTUNES, L.M.G.; DARIN, J.D.C.; BIANCHI, M.L.P. Protective effects of Vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study, **Pharmacological Research**, London, v. 41, n. 4, p. 405-411, 2000.

ANTUNES, L.M.G.; PASCOAL, L.M.; BIANCHI, M.L.P.; DIAS, F.L. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 585, n. 1-2, p. 113-9, 2005.

ARAÚJO, M.C.; DIAS, F.L.; TAKAHASHI, C.S. Potentiation by turmeric and curcumin of gamma-radiation-induced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells. **Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis**, New York, v. 19, n. 1, p. 9-18, 1999.

ARAÚJO, M.C.P.; ANTUNES, L.M.G.; TAKAHASHI, C.S. Protective effect of thiourea, a hydroxyl-radical scavenger, on curcumin-induced chromosomal aberrations in an in vitro mammalian cell system. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, New York, v. 21, n. 2, p. 175-180, 2001.

ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 523-524, p. 9-20, 2003.

BALA, K.; TRIPATHY, B.C.; SHARMA, D. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. **Biogerontology**, Boston, v. 7, n. 2, p. 81-89, 2006.

BODO, J.; CHOVANCOVA, J.; HUNAKOVA, L.; SEDLAK, J. Enhanced sensitivity of human ovarian carcinoma cell lines A2780 and A2780/CP to the combination of cisplatin and synthetic isothiocyanate ethyl 4-isothiocyanatobutanoate. **Neoplasma**, Bratislava, v. 52, n. 6, p. 510-516, 2005.

BRABEC, V.; KASPARKOVA. Modifications of DNA by platinum complexes relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. **Drug Resistance Updates**, Edinburgh, v. 8, n. 3, p. 131-146, 2005.

CAO, J.; JIA, L.; ZHOU, H.M.; LIU, Y.; ZHONG, L.F. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 91, n. 2, p. 476-483, 2006.

CAO, J.; JIANG, L.P.; LIU, Y.; YANG, G.; YAO, X.F.; ZHONG, L.F. Curcumin-induced genotoxicity and antigenotoxicity in HepG2 cells. **Toxicon**, New York, v. 49, n. 8, p. 1219-1222, 2007.

CHAN, W.H.; WU, H.Y.; CHANG, W.H. Dosage effects of curcumin on cell death types in a human osteoblast cell line. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 44, n. 8, p. 1362-1371, 2006.

CHANEY, S.G.; CAMPBELL, S.L.; TEMPLE, B.; BASSETT, E.; WU, Y.; FALDU, M. Protein interections with platinum-DNA adducts: from structure to function. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 98, n. 10, p. 1551-1559, 2004.

CHO, J.M.; MANANDHAR, S.; LEE, H.R.; PARK, H.M.; KWAK, M.K. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 260, p. 96-108, 2008.

COLLINS, A. R.; DUTHIE, S. J.; DOBSON, V. L. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. **Carcinogenesis**, v.

14, n. 9, p. 1733-1735, 1993.

COLOGNATO, R.; LAURENZA, I.; FONTANA, I.; COPPEDE, F.; SICILIANO, G.; COECKE, S.; ARUOMA, O.I.; BENZI, L.; MIGLIORE, L. Modulation of hydrogen peroxide-induced DNA damage, MAPKs activation and cell death in PC12 by ergothioneine. **Clinical Nutrition**, Oxford, v. 25, p. 135-145, 2006.

CONKLIN, K.A. Cancer, chemotherapy and antioxidants. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.134, p. 3202S-3204S, 2004.

DAJAS, F.; RIVERA, F.; BLASINA, F.; ARREDONDO, F.; ECHEVERRY, C.; LAFON, L.; MORQUIO, A.; HEIZEN, H. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. **Neurotoxicity Research**, Amsterdam, v. 5, n. 5, p. 377-384, 2003a.

DAJAS, F.; RIVERA-MEGRET, F.; BLASINA, F.; ARREDONDO, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; COSTA, G.; ECHEVERRY, C.; LAFON, L.; HEIZEN, H.; FERREIRA, M.; MORQUIO, A. Neuroprotection by flavonoids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 36, n. 12, p. 1613-1620, 2003b.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 55, p. 396-407, 1997.

DEIANA, M.; ROSA, A.; CASU, V.; PIGA, R.; ASSUNTA-DESSI, M.; ARUOMA, O.I. L-ergothioneine modulates oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of polynsaturated fatty acids. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v. 23, n. 2, p. 183-193, 2004.

DONZELLI, E.; CARFI, M.; MILOSO, M.; STRADA, A.; GALBIATI, S.; BAYSSAS, M.; GRIFFON-ETIENNE, G.; CVALETTI, G.; PETRUCCIOLI, M.G.; TREDICI, G. Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **Journal of Neuro-**

Oncology, Boston, v. 67, p. 65-73, 2004.

EIGNER, D.; SCHOLZ, D. Ferula asa-foetida and Curcuma longa in traditional medical treatment and diet in Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 67, p. 1-6, 1999.

ELSEENDOORN, T.J.; WEIJL, N.I.; MITHOE, S.; ZWINDERMAN, A.H.; VAN DAM, F.; DE ZWART, F.A.; TATES, A.D.; OSANTO, S. Chemotherapy-induced chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients supplemented with antioxidants or placebo. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 498, n. 1-2, p. 145-158, 2001.

FENECH, M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 40, p. 1113-1117, 2002.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The HUMAN MicroNucleus project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 428, p. 271-283, 1999.

FISCHER, S.J.; BENSON, L.M.; FAUQ, A.; NAYLOR, S.; WINDEBANK, A.J. Cisplatin and dimethyl sulfoxide react to form an adducted compound with reduced cytotoxicity and neurotoxicity. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 444-452, 2008.

GANIGER, S.; MALLESHAPPA, H.N.; KRISHNAPPA, H.; RAJASHEKHAR, G.; RAO, V.R.; SULLIVAN, F. A two generation reproductive toxicity study with curcumin,

turmeric yellow, in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 45, n. 1, p. 64-69, 2007.

GARTLON, J.; KINSNER, A.; BAL-PRICE, A.; COECKE, S.; CLOTHIER, R.H. Evaluation of a proposed *in vitro* test strategy using neuronal and non-neuronal cell systems for detecting neurotoxicity. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, p. 1569-81, 2006.

GILL, J.S.; WINDEBANK, A.J. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 101, n. 12, p. 2842-2850, 1998.

GIRI, A.; KHYNRIAM, D.; PRASAD, S.B. Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 421, n. 2, p. 139-148, 1998.

GOETHEM, V.F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 392, p. 31-43, 1997.

GUPTA, Y.K.; SHARMA, S.S. Antiemetic activity of antioxidants against cisplatin induced emesis in dogs, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 1, p. 179-184, 1996.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, Auckland, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HARTMANN, A.; KISKINIS, E.; FJAEELLMAN, A.; SUTER, W. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. **Mutation**

Research, Amsterdam, v. 497, n. 1-2, p. 199-212, 2001.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vitro* test for chromosome damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 18, p. 187-192, 1973.

INCA: Instituto Nacional do Câncer (2008). Home page: www.inca.gov.br. Acessado em 07/04/2008.

JAMIESON, E.R.; LIPPARD, S.J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. **Chemical reviews**, Easton, v. 99, p. 2467-2498, 1999.

KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 478, n. 1-2, p. 23-43, 2001.

KIM, D.S.H.L.; PARK, S.Y.; KIM, J.Y. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from β A(1-42) insult. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 303, p. 57-61, 2001.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 540, p. 153-163, 2003.

KLEIN, R.; BROWN, D.; TURNLEY, A. M. Phenoxodiol protects against Cisplatin induced neurite toxicity in a PC-12 cell model. **BMCNeuroscience**, v. 8, n. 61, 2007.

KOSMIDER, B.; WYSZYNSKA, K.; JANIK-SPIECHOWICZ, E.; OSIECKA, R.; ZYNER, E.; OCHOCKI, J.; CIESIELSKA, E.; WASOWICZ, W. Evaluation of the genotoxicity of *cis*-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) in comparison with *cis*-DDP. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 558, p. 93-110, 2004.

KUNCHANDY, E.; RAO, M.N.A. Oxygen radical-scavenging activity of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 58, p. 237-240, 1990.

LIU, Q.Z.; JIANG, G.F.; HE, Y.; WANG, X.R.; ZHOU, J.W.; ZHUANG, Z.X. Arsenite-induced alterations in Ku70-deficient cells: a model to study genotoxic effects. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, Washington, v. 70, n. 11, p. 938-946, 2007.

MAHESHWARI, R.K.; SINGH, A.K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R.C. Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences**, Oxford, p.1-7, 2006.

MARZANO, C.; BETTIO, F.; BACCICHETTI, F.; TREVISAN, A.; GIOVAGNINI, L.; FREGONA, D. Antitumor activity of a new platinum(II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 148, p. 37-48, 2004.

MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARI, R.; FILES, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005.

MASUDA, H.; TANAKA, T.; TAKAHAMA, U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 203, n. 2, p. 1175-80, 1994.

MCDONALD, E.S.; RANDON, K.R.; KNIGHT, A.; WINDEBANK, A.J. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: A potential mechanism for neurotoxicity. **Neurobiology of Disease**, Amsterdam, v. 18, p. 305-313, 2005.

MIDDLETON, E.JR.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; DRAGO, G.; IBARRA, J.; CIOCCA, D.R. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from health individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 21, p.11-14, 2005.

NARUSE, T.; NISHIDA, Y.; ISHIGURO, N. Synergistic effects of meloxicam and conventional cytotoxic drugs in human MG-63 osteosarcoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 61, n. 6, p. 338-346, 2007.

NESSLANY, F.; ZENNOUCHE, N.; SIMAR-MEINTIÈRES, S.; TALAHARI, I.; NKILI-MBOUI, E.N.; MARZIN, D. In vivo Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutation research**, Amsterdam, v. 630, p. 28-41, 2007.

OLIVE, P.L.; FRAZER, G.; BANATH, J.P. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the Comet assay. **Radiation Research**, New York, v. 136, n. 1, p. 130-136, 1993.

OSAWA, T.; SUGIYAMA, Y.; INAYOSHI, M.; KAWAKISHI, S. Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, n. 9, p. 1609-1612, 1995.

OZTURK, O.H.; BOZCUK, H.; BURGUCU, D.; EKINCI, D.; OZDOGAN, M.; AKCA, S.; YILDIZ, M. Cisplatin cytotoxicity is enhanced with zoledronic acid in A549 lung

cancer cell line: Preliminary results of an *in vitro* study. **Cell Biology International**, London, v. 31, n. 9, p. 1069-1071, 2007.

PACE, A; SAVARESE, A; PICARDO, M; MARESCA, V; PACETTI, U; DEL MONTE, G; BIROCCIO, A; LEONETTI, C; JANDOLO, B; COGNETTI, F; BOVE, L. Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 21, n. 5, p. 927-931, 2003.

PANG, S.K.; YU, C.W.; AU-YEUNG, S.C.; HO, Y.P. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 363, n. 1, p. 235-240, 2007.

PAVLICA, S.; GEBHARDT, R. Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 39, n. 12, p. 1377-1390, 2005.

PIGA, R.; SAITO, Y.; YOSHIDA, Y.; NIKÉ, E. Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidants. **Neurotoxicology**, Philadelphia, v. 28, n. 1, p. 67-75, 2007.

PISANO, C.; PRATESI, G.; LACCABUE, D.; ZUNINO, F.; GIUDICE, P.; BELLUCCI, A.; PACIFICI, L.; CAMERINI, B.; VESCI, L.; CASTORINA, M.; CICUZZA, S.; TREDICI, G.; MARMIROLI, P.; NICOLINI, G.; GALBIATI, S.; CALVANI, M.; CARMINATI, P.; CAVALETTI, G. Paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity: A protective role of acetyl-L-carnitine. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 9, p. 5756-5767, 2003.

RAGUNATHAN, I.; PANNEERSELVAM, N. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in *Allium cepa*. **Journal of Zhejiang University Science B**, Hangzhou, v. 8, n. 7, p. 470-475, 2007.

RODILLA, V.; PELLICER, J.A.; PERTUSA, J.; MOTHERSILL, C. Induction of micronucleated and binucleate cells in Chinese hamster ovary (CHO) cells by *cis-diamminedichloroplatinum* (II): a morphological and morphometric study. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 241, p. 115-124, 1990.

ROSA, R.M.; MOURA, D.J.; SILVA, A.C.R.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 631, N. 1, p. 44-54, 2007.

ROSEMBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. **Cancer**, New York, v. 55, p. 2303-2316, 1985.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; OLIVEIRA, M.D.M.; PEREIRA, C.A.B.; BEÇA, W. The protective effect of β - caroteno on genotoxicity induced by cyclophosphamie. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 265, p. 237-244, 1992.

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

SHARMA, R.A.; GESCHER, A.J.; STEWARD, W.P. Curcumin: the story so far. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 41, p. 1955-1968, 2005.

SHEIKH-HAMAD, D. Editorial focus on cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. **American journal of physiology. Renal physiology**, Bethesda, 2008. In press.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, n. 4, p. 353-356, 1998.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell**

Research, New York, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SINGH, S.; KHAR, A. Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 6, n. 3, p. 259-270, 2006.

SOOBRAATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA A.; ARUOMA, O.I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 579, p. 200-213, 2005.

SRINIVASAN, M.; PRASAD, R. N.; MENON, V.P. Protective effect of curcumin on gamma-radiation induced DNA damage and lipid peroxidation in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 611, n. 1-2, p. 96-103, 2006.

SURRALLÉS, J.; XAMENA, N.; CREUS, A.; CATALÁN, J.; NORPPA, H.; MARCOS, R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocytes cultures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 341, p. 169-184, 1995.

SZETO, Y.T.; COLLINS, A.R.; BENZIE, I.F. Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 500, n. 1-2, p. 31-38, 2002.

THANGAPAZHAM, R.L.; SHARMA, A.; MAHESHWARI, R.K. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, Arlington, v. 8, n. 3, p. 443-449, 2006.

THOMPSON, S.W.; DAVIS, L.E.; KORNFELD, M.; HILGERS, R.D.; STANDEFER, J.C. Cisplatin neuropathy: Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicology studies. **Cancer**, New York, v. 54, p. 1269-1275, 1984.

TICE, R.R.; AGUVELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHY, H. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, p. 206-221, 2000.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews**, London, v. 4, n. 4, p. 307-320, 2005.

WANG, L.; NISHIDA, H.; OGAWA, Y.; KONISHI, T. Prevention of oxidative injury in PC12 cells by a traditional Chinese medicine, Shengmai San, as a model of an antioxidant-based composite formula. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 7, p. 1000-1004, 2003.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 23, n. 4, p. 209-240, 1997.

WILKES, G. Peripheral neuropathy related to chemotherapy. **Seminars in Oncology Nursing**, Orlando, v. 23, n. 3, p. 162-173, 2007.

WITTE, I.; PLAPPERT, U.; de WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 97, n. 1, p. 21-26, 2007.

WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 147, n. 3, p. 309-318, 2004.

ZBARSKY, V.; DATLA, K.P.; PARKAR, S.; RAI, D.K.; ARUOMA, O.I.; DEXTER, D.T. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and

naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease.

Free Radical Research, Yverdon, v. 39, n. 10, p. 1119-1125, 2005.

ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript?

Mutation Research, Amsterdam, v. 626, n. 1-2, p. 1-3, 2007.