UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e
expressão dos genes *Tp53* e *Ephx2* em ratos tratados com
*Caryocar villosum***

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Toxicologia da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título em Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Mara Ribeiro de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires
Bianchi

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Toxicologia no dia 01/03/2013. A versão original encontra-se
disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto

2012

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.

Catálogo da Publicação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Almeida, Mara Ribeiro De.

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e expressão dos genes *Tp53* e *Ephx2* em ratos tratados com *Caryocar villosum* / Mara Ribeiro de Almeida ; orientadora Maria de Lourdes Pires Bianchi. – Ribeirão Preto, 2012.

Tese (Doutorado)—Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2012.

1. Piquiá. 2. Ensaio do cometa. 3. Micronúcleo. 4. Compostos fenólicos. 5. Nutrigenômica. I. Bianchi, Maria de Lourdes Pires. II. Título.

Foto da capa de autoria de Renan Campos Chisté

Nome: ALMEIDA, Mara Ribeiro de

Título: Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e expressão dos genes *Tp53* e *Ephx2* em ratos tratados com *Caryocar villosum*

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jânio Ferreira de Almeida e Maida Aparecida Ribeiro de Almeida, pelo imenso amor com que me criaram e por serem os responsáveis pela minha formação, oferecendo todas as condições, seja financeira, moral e intelectual, que me permitiram alcançar esse objetivo. Vocês foram e são o meu alicerce, são meus companheiros de vida e são meus maiores exemplos de amor verdadeiro. Não existem palavras que expressem os meus sentimentos de gratidão eterna por vocês. Essa conquista também é de vocês. Com todo o meu amor...

...aos meus irmãos, Vitor Ribeiro de Almeida (*in memoriam*) e Flávio Ribeiro de Almeida, que sempre estiverem ao meu lado me dando forças para continuar a caminhada e que me ofereceram amor incondicional. Com todo o meu carinho e respeito...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus as oportunidades oferecidas que me permitiram alcançar esse objetivo, as bênçãos recebidas e principalmente a Sua presença nos momentos difíceis.

Agradeço à minha querida orientadora Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi, a confiança, atenção, respeito e acima de tudo a sua amizade. Nossa convivência me proporcionou um grande crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada por acreditar em mim e por permitir que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa. Obrigada por oferecer toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do projeto. Meus sinceros agradecimentos.

Gostaria de expressar o meu agradecimento à Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, a imprescindível colaboração, fornecendo a matéria prima necessária, o piquiá, para o desenvolvimento do projeto. Acima de tudo, agradeço o respeito e a confiança.

Ao Dr. Renan Campos Chisté a valiosa colaboração através do processamento das amostras da polpa do piquiá. Agradeço em especial a presteza, solicitude e respeito a mim dedicados.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP a disponibilização do aparelho de PCR em tempo real.

Agradeço às funcionárias Fabíola Singaretti de Oliveira e Milla Sproni Tavares, do laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, a grande ajuda com a PCR em tempo real.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrigenômica, Regislaine Valéria Burim e Jefferson Codognotto, a dedicação com que sempre me ajudaram.

Agradeço em especial à funcionária Joana D'Arc Castania Darin, a imensa ajuda durante a realização de alguns experimentos e principalmente durante o

tratamento e eutanásia dos animais. Muito obrigada pela disposição com que você sempre me ajudou.

Aos alunos e ex-alunos de pós graduação do Laboratório de Nutrigenômica, Alexandre Ferro Aissa, Juliana Ribeiro e Tarsila D. U. H. Gomes, meus sinceros agradecimentos pela dedicação com que me ajudaram durante o desenvolvimento do trabalho. Ajuda esta desde as discussões sobre os protocolos até a bancada durante a realização dos experimentos. Sem vocês, a realização desse projeto não seria possível.

Agradeço à Lívia Cristina Hernandez, que me auxiliou nos experimentos, contribuindo muito para o desenvolvimento do trabalho. Além dessa assistência no laboratório, se mostrou uma grande amiga, sempre ao meu lado nos momentos difíceis. Saber que podemos confiar em algumas pessoas e termos o prazer de compartilhar a vida com essas pessoas são caminhos que nos levam ao sucesso e, conseqüentemente, à felicidade. Muito obrigada, Lívia, pelo carinho, confiança e dedicação.

Às minhas amigas Farah Chequer e Paula Lumy Takeuchi. Muito obrigada pela amizade, confiança, consideração e respeito. Saibam que, da mesma forma que eu pude contar com vocês em muitos momentos, vocês também podem contar comigo.

Agradeço à Juliana Mara Serpeloni, que além de ter sido minha colega na pós graduação e no laboratório, se tornou uma grande amiga. Sou muito grata pela oportunidade de conviver com você. Essa amizade me deu coragem para continuar a caminhada e me deu forças em muitos momentos difíceis. Compartilhamos tantos momentos, desabafamos tantas angústias, mas também compartilhamos muitas alegrias. Amizades assim são bênçãos de Deus e que, mesmo com a distância, vou guardar para sempre no meu coração.

Ao Vinícius Venâncio, que de mansinho chegou no laboratório e aos poucos fomos nos tornando grandes amigos. Você Vinícius, foi meu ombro direito em muitos momentos de angústia, assim como também compartilhou comigo muitos momentos

de felicidade. Muito obrigada por sua amizade, e mais importante, muito obrigada pela sinceridade com que você sempre me tratou.

Agradeço em especial à minha tia e madrinha, Valéria Ribeiro Lemos, que considero como minha segunda mãe. Que ajudou na minha criação desde o meu nascimento e até hoje participa da minha vida. O carinho e o amor que você sempre me dedicou me deram forças para conquistar todos meus objetivos. Muito obrigada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 2009/15692-0) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) a concessão da bolsa de pesquisa. Agradeço também o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) os auxílios de pesquisa concedidos.

RESUMO

ALMEIDA, M. R. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e expressão dos genes *Tp53* e *Ephx2* em ratos tratados com *Caryocar villosum***. 2012. 102 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O consumo de frutas e verduras está relacionado com a promoção da saúde porque tem sido associado com a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas como, por exemplo, câncer e doenças degenerativas e cardiovasculares. Dessa forma, o estudo dos efeitos biológicos desses alimentos tem ganhado atenção nos últimos anos. O piquiá (*Caryocar villosum*) é um fruto nativo da Amazônia e é rico em compostos antioxidantes como os compostos fenólicos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos *in vivo* da polpa liofilizada do piquiá e também de seu extrato etanólico. Além disso, os compostos fitoquímicos presentes na polpa e no seu extrato foram quimicamente determinados. Ratos Wistar foram tratados por gavagem, durante 14 dias consecutivos, com três diferentes doses da polpa do piquiá (75, 150 ou 300 mg/kg p.c.) ou com seu extrato etanólico (75 mg/kg p.c.). No 14º dia, os animais receberam solução salina (NaCl 0,9%, i.p.) ou doxorrubicina (DXR, 15 mg/kg p.c., i.p.) e após 24 horas foram eutanasiados. A medula óssea e o sangue periférico foram usados no teste do micronúcleo (MN), e o fígado, rins e coração foram utilizados nos ensaios do cometa, nas análises bioquímicas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutatona reduzida (GSH) e na avaliação da expressão de mRNA dos genes epóxido hidrolase (*Ephx2*) e proteína tumoral p53 (*Tp53*). A polpa do piquiá não apresentou efeito genotóxico nem mutagênico em nenhuma das doses avaliadas, demonstrou atividade antigenotóxica e ainda reduziu os níveis de TBARS induzidos pela DXR no coração. Efeitos opostos foram encontrados para o extrato etanólico da polpa do piquiá, por apresentar genotoxicidade, mas não mutagenicidade, e indução de TBARS no coração. Os níveis de mRNA do gene *Ephx2* no rim e coração foram aumentados após o tratamento com a maior dose da polpa do piquiá, entretanto, no rim a menor dose diminuiu a transcrição desse gene induzida pela DXR. No fígado as doses de 75 e 300 mg/kg p.c. diminuíram os níveis de mRNA do gene *Ephx2* induzidos pela DXR. A dose de 300 mg/kg p.c. da polpa diminuiu a expressão de mRNA do gene *Tp53* nos grupos da associação piquiá + DXR no fígado, rim e coração. O extrato etanólico da polpa do piquiá modulou a expressão de mRNA do gene *Ephx2* apenas no fígado, aumentando os níveis desse transcrito, enquanto que no coração houve diminuição da transcrição do gene *Tp53*. Foi encontrada uma diferença de composição fitoquímica entre a polpa liofilizada e seu extrato etanólico. O extrato apresentou 1,4x mais compostos fenólicos e 3x menos carotenoides quando comparado com a polpa. Além disso, o ácido gálico foi o composto fenólico predominante na polpa, enquanto que no extrato o fenol mais abundante foi o ácido elágico. A diferença dos efeitos biológicos entre a polpa liofilizada do piquiá e seu extrato etanólico pode ser devido à alteração da composição fitoquímica.

Palavras-chave: Piquiá, ensaio do cometa, micronúcleo, compostos fenólicos, nutrigenômica

ABSTRACT

ALMEIDA, M. R. **Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, antigenotoxicity and expression of *Tp53* and *Ephx2* genes in rats treated with *Caryocar villosum*.** 2012. 102 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Fruit and vegetables intake has been related to the promotion of health because it has been associated to reduced risk of chronic diseases development such as cancer, and cardiovascular and degenerative diseases. Thus, the study of the biological effects of these foods has increased in recent years. Piquiá (*Caryocar villosum*) is a fruit native of the Amazon and it is rich in antioxidant compounds such as phenolic compounds. Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vivo* genotoxicity and antigenotoxicity effects of the piquiá lyophilized pulp fruit and its ethanolic extract. Moreover, the phytochemical characterization of pulp and extract was determined. Wistar rats were treated by gavage, for 14 days, with three doses of piquiá pulp (75, 150 or 300 mg/kg b.w.) or with its ethanolic extract (75 mg/kg b.w.). On 14th day, the animals received saline (0.9% i.p.) or doxorubicin (DXR, 15 mg/kg b.w.) and after 24 hours they were euthanized. Bone marrow and peripheral blood were used in micronucleus (MN) test, and the liver, kidney and heart were used in comet assay, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reduced glutathione (GSH), and in the evaluation of mRNA expression of epoxide hydrolase (*Ephx2*) and tumor protein p53 (*Tp53*) genes. The piquiá pulp was not genotoxic nor mutagenic, demonstrated antigenotoxic effects and reduced the TBARS levels induced by DXR in heart. The ethanolic extract had opposite effects, whereas it was genotoxic, but not mutagenic, and increased the TBARS levels in heart. *Ephx2* mRNA levels in kidney and heart were increased after treatment with the higher dose of piquiá pulp, however, in kidney the lowest dose decreased the transcription of this gene induced by DXR. In liver, the 75 and 300 mg/kg b.w. doses of piquiá pulp decreased the *Ephx2* mRNA levels induced by DXR. The piquiá pulp 300 mg/kg + DXR group, presented lower levels of *Tp53* mRNA in liver, kidney and heart. The ethanolic extract of piquiá pulp modulated the mRNA *Ephx2* expression only in the liver, increasing the levels of this transcript, while in the heart decreased the transcription of *Tp53* gene. There was a difference on phytochemical composition between the pulp and its ethanolic extract. The extract presented 1.4-fold more phenolic compounds and 3-fold less carotenoids than piquiá pulp. Furthermore, gallic acid was the predominant phenol in the pulp, whereas in the ethanolic extract the most abundant phenol was the ellagic acid. The difference in the biological effects between piquiá pulp and its ethanolic extract may be due the change of the phytochemical composition.

Keywords: Piquiá, comet assay, micronucleus, phenolics, nutrigenomics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Piquiá	16
Figura 2: Fotomicrografias de nucleoides de células do coração de ratos Wistar. (a) nucleoide sem dano e (b) nucleoide com dano.	21
Figura 3: Fotomicrografia de eritrócitos normocromático (NCE) e policromático (PCE) de medula óssea de rato Wistar.	22
Figura 4: Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos (PCEs) de sangue periférico de rato Wistar.	23
Figura 5: Delineamento experimental	38
Figura 6: Curvas padrões de (a) 1,1,3,3 tetramethoxypropano e (b) α -cisteína....	41
Figura 7: Fotos de gel de agarose contendo RNA total de (a) fígado, (b) rim e (c) coração de ratos Wistar	44
Figura 8: Curvas de <i>melting</i> dos <i>primers</i> <i>Rps29</i> , <i>Hprt1</i> , <i>Tp53</i> e <i>Ephx2</i>	47
Figura 9: Curvas de amplificação dos <i>primers</i> <i>Rps29</i> , <i>Hprt1</i> , <i>Tp53</i> e <i>Ephx2</i> em amostras de rim de ratos Wistar do grupo óleo mineral.....	47
Figura 10: Gráficos da regressão linear das curvas padrões dos <i>primers</i> (a) <i>Rps29</i> , (b) <i>Hprt1</i> , (c) <i>Ephx2</i> e (d) <i>Tp53</i>	48
Figura 11: Gráficos dos experimentos de validação. a) <i>Ephx2</i> e <i>Rp29</i> ; b) <i>Ephx2</i> e <i>Hprt1</i> ; c) <i>Tp53</i> e <i>Rps29</i> ; d) <i>Tp53</i> e <i>Hprt1</i>	49
Figura 12: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da polpa liofilizada do piquiá....	52
Figura 13: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá.	54
Figura 14: %DNA na cauda em células do fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com a polpa liofilizada do piquiá em diferentes doses (75, 150 e 300 mg/kg p.c.) e sua associação com doxorrubicina (15 mg/kg p.c., i.p.).....	59
Figura 15: %DNA na cauda em células do fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com o extrato etanólico da polpa do piquiá (75 mg/kg p.c) e sua associação com doxorrubicina (15 mg/kg p.c., i.p.).	62
Figura 16: Relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE) (PCE/NCE) na medula óssea de ratos Wistar tratados com a polpa do piquiá em diferentes doses (75, 150 ou 300 mg/kg, p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (15 mg/kg p.c., i.p.).	65

Figura 17: Relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE) (PCE/NCE) na medula óssea de ratos Wistar tratados com o extrato da polpa do piquiá (75 mg/kg p.c.) associado ou não ao antitumoral doxorrubicina (15 mg/kg p.c., i.p.).	65
Figura 18: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE) na medula óssea e sangue periférico de ratos Wistar tratados com a polpa do piquiá em três diferentes doses (75, 150 ou 300 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (15 mg/kg p.c., i.p.).	66
Figura 19: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE) na medula óssea e sangue periférico de ratos Wistar tratados com o extrato da polpa do piquiá (75 mg/kg p.c.), associado ou não ao antitumoral doxorrubicina (15 mg/kg p.c., i.p.).	69
Figura 20: Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com a polpa liofilizada do piquiá (75, 150 ou 300 mg/kg p.c.).	70
Figura 21: Determinação da glutathiona reduzida (GSH) em fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com a polpa liofilizada do piquiá (75, 150 ou 300 mg/kg p.c.).	71
Figura 22: Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com o extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá (75 mg/kg p.c.).	73
Figura 23: Determinação da glutathiona reduzida (GSH) em fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com o extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá (75 mg/kg p.c.).	74
Figura 24: Expressão relativa de mRNA do gene <i>Ephx2</i> em fígado, rim e coração de ratos tratados com a polpa liofilizada do piquiá (75 e 300 mg/kg p.c.) associada ou não a doxorrubicina (DXR, 15 mg/kg p.c.).	77
Figura 25: Cascata do ácido araquidônico enfatizando a conversão dos principais epóxidos anti-inflamatórios a seus 1,2-diois pela enzima epóxido hidrolase solúvel (sEH).	78
Figura 26: Expressão relativa de mRNA do gene <i>Tp53</i> em fígado, rim e coração de ratos tratados com a polpa liofilizada do piquiá (75 e 300 mg/kg p.c.) associada ou não a doxorrubicina (DXR, 15 mg/kg p.c.).	80
Figura 27: Expressão relativa de mRNA do gene <i>Ephx2</i> em fígado, rim e coração de ratos tratados com o extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá (75 mg/kg p.c.) associada ou não a doxorrubicina (DXR, 15 mg/kg p.c.).	83
Figura 28: Expressão relativa de mRNA do gene <i>Tp53</i> em fígado, rim e coração de ratos tratados com o extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá (75 mg/kg p.c.) associada ou não a doxorrubicina (DXR, 15 mg/kg p.c.).	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantificação e grau de pureza ($A_{260/280}$ e $A_{260/230}$) do RNA total extraído de fígado, rim e coração de ratos Wistar	43
Tabela 2: Sequência dos <i>primers</i> utilizados na RT-qPCR e comprimento dos fragmentos amplificados (<i>amplicon</i>)	45
Tabela 3: Compostos fitoquímicos da polpa liofilizada do piquiá (base seca)	53
Tabela 4: Compostos fitoquímicos do extrato etanólico da polpa do piquiá	54
Tabela 5: Média $\pm$ desvio padrão da variação do peso corpóreo (diferença entre o peso corpóreo no último dia de tratamento e o peso no primeiro dia) e relações do peso dos órgãos/peso corpóreo de ratos Wistar tratados com diferentes doses da polpa do piquiá, associada ou não a doxorubicina (15 mg/kg p.c., i.p.)	56
Tabela 6: Média $\pm$ desvio padrão da variação do peso corpóreo (diferença entre o peso corpóreo no último dia de tratamento e o peso no primeiro dia) e relações do peso dos órgãos/peso corpóreo de ratos Wistar tratados com o extrato da polpa do piquiá (75 mg/kg p.c.), associado ou não a doxorubicina (15 mg/kg p.c., i.p.)	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Piquiá (<i>Caryocar villosum</i>)	15
1.2 Doxorubicina	17
1.3 Ensaios de genotoxicidade e antigenotoxicidade	20
1.4 Biomarcadores de estresse oxidativo	23
1.5 Genes epóxido hidrolase 2 (<i>Ephx2</i>) e proteína tumoral p53 (<i>Tp53</i>)	24
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Piquiá (<i>Caryocar villosum</i>)	30
3.1.1 Preparo da polpa liofilizada	30
3.1.2 Preparo do extrato etanólico da polpa do piquiá	30
3.1.3 Determinação dos compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos e carotenoides da polpa liofilizada do piquiá	31
3.1.4 Determinação dos compostos fenólicos e carotenoides totais do extrato da polpa liofilizada do piquiá	32
3.1.5 Caracterização e quantificação fitoquímica	33
3.2 Doxorubicina	35
3.3 Animais e protocolo experimental	35
3.4 Ensaio do cometa em células de fígado, rim e coração	38
3.5 Teste do micronúcleo (MN) em medula óssea e em sangue periférico de roedores	39
3.6 Dosagem de GSH e TBARS em fígado, rim e coração de ratos	40
3.7 Expressão de mRNA dos genes <i>Ephx2</i> e <i>Tp53</i> por PCR em tempo real (RT-qPCR)	41
3.7.1 Extração de RNA total	41
3.7.2 Avaliação qualitativa e quantitativa do RNA total por espectrofotometria	42
3.7.3 Avaliação da integridade do RNA total	44
3.7.4 Síntese de cDNA	45
3.7.5 Síntese dos <i>primers</i> e escolha dos genes de referência	45
3.7.6 Condições da RT-qPCR	46
3.7.7 Validação da RT-qPCR	46
3.8 Análise estatística	50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Composição fitoquímica da polpa liofilizada do piquiá	52
4.2 Composição fitoquímica do extrato etanólico da polpa do piquiá.....	53
4.3 Variação do peso corpóreo e relação entre peso dos órgãos e peso corpóreo.....	55
4.4 Ensaio do cometa em fígado, rim e coração	57
4.4.1 Avaliação da genotoxicidade e da antigenotoxicidade da polpa liofilizada do piquiá	57
4.4.2 Avaliação da genotoxicidade do extrato etanólico da polpa do piquiá.....	61
4.5 Teste do micronúcleo.....	64
4.5.1 Avaliação dos efeitos citotóxicos do tratamento com a polpa liofilizada do piquiá nas células da medula óssea	64
4.5.2 Avaliação dos efeitos citotóxicos do tratamento com o extrato etanólico da polpa do piquiá nas células da medula óssea.....	65
4.5.3 Avaliação da mutagenicidade e da antimutagenicidade da polpa liofilizada do piquiá	66
4.5.4 Avaliação da mutagenicidade e da antimutagenicidade do extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá.....	68
4.6 Avaliação bioquímica de TBARS e GSH	69
4.6.1 Avaliação bioquímica de TBARS e GSH em ratos tratados com a polpa liofilizada do piquiá	69
4.6.2 Avaliação bioquímica de TBARS e GSH em ratos tratados com o extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá.....	73
4.7 Expressão de mRNA dos genes <i>Ephx2</i> e <i>Tp53</i>	75
4.7.1 Expressão de mRNA dos genes <i>Ephx2</i> e <i>Tp53</i> em ratos tratados com a polpa do piquiá	75
4.7.2 Expressão de mRNA dos genes <i>Ephx2</i> e <i>Tp53</i> em ratos tratados com o extrato etanólico da polpa do piquiá.....	82
 5. CONCLUSÕES	 86
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 88
 ANEXO.....	 102
ANEXO A- Certificado CEUA.....	102

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Piquiá (*Caryocar villosum*)

O consumo de frutas e vegetais está relacionado com a promoção da saúde porque tem sido associado com a redução do risco de desenvolvimento de muitas doenças crônicas como, por exemplo, câncer e doenças degenerativas e cardiovasculares (ESFAHANI et al., 2011; HUNG et al., 2004). Os compostos presentes nesses alimentos apontados como os responsáveis pelos efeitos benéficos são os chamados compostos bioativos, como vitaminas, fenóis, carotenoides e fibras (ESFAHANI et al., 2011). Vários são os mecanismos pelos quais os compostos bioativos exercem seus efeitos salutareos e entre eles destacam-se a ação antioxidante e a proteção sobre o material genético. Apesar dos efeitos benéficos, os compostos presentes nos alimentos, em determinadas situações, podem não ser inócuos e causar danos ao DNA (BOEIRA et al., 2010; GROVER et al., 2009; OSOWSKI et al., 2010).

Um mutágeno pode ser definido como um agente físico ou químico que altera o material genético, aumentando a frequência de mutações acima dos níveis basais. Por outro lado, um anti-mutágeno é qualquer substância que reduz a taxa de mutações espontâneas ou diminui ou reverte a ação de um mutágeno (FERGUSON, 2011). As mutações nas células somáticas não apenas estão envolvidas com a carcinogênese, mas também podem causar outras desordens como aterosclerose, doenças cardíacas e degenerativas. Uma vez que os mutágenos estão envolvidos na iniciação e progressão de diversos tipos de doenças, a investigação de compostos bioativos que neutralizem esses efeitos mutagênicos tem crescido ultimamente (BHATTACHARYA, 2011). Dessa forma, a avaliação dos potenciais genotóxico e antígeno-tóxico dos alimentos tornou-se um evento crítico e importante na promoção da saúde, e a exploração de espécies exóticas de frutos tem ganhado atenção nos últimos anos. A região Amazônica, que é a maior área florestal tropical do mundo, oferece uma variedade de espécies de frutos que ainda não foram explorados e industrializados (GORDON et al., 2011) e entre essas espécies encontra-se o piquiá (*Caryocar villosum*).

O piquazeiro pertence à grande família das Caryocaraceae e se encontra amplamente distribuído pela América tropical, principalmente na região da floresta Amazônica. Seus frutos e troncos são usados tradicionalmente pelos povos nativos da Amazônia como alimento e na construção de casas e barcos, respectivamente. As árvores do piquazeiro são altas (40 a 50 metros), a floração ocorre na estação seca de julho a novembro, enquanto que a frutificação ocorre na estação chuvosa de março a maio (MARX; ANDRADE; MAIA, 1997).

Os frutos do piquazeiro são globulares e irregulares, com aproximadamente 7-9 cm de diâmetro e possuem casca de cor acinzentada, que pode ser facilmente removida. A principal fonte de alimento do piquiá é o mesocarpo, camada oleosa de até 11 mm de espessura em volta das sementes de textura amanteigada e coloração amarelada. As sementes possuem forma de rim, são oleosas, comestíveis, apresentam coloração branca e podem ser encontradas entre 1 a 4 sementes por fruto. A polpa do piquiá, que normalmente é consumida após cozimento em água salgada ou cozida em conjunto com arroz ou feijão, é muito apreciada pelos habitantes da região devido à sua agradável fragrância e ótimo sabor. Ocasionalmente, o óleo é extraído do mesocarpo e pode ser usado como óleo de salada ou como óleo para cozinhar (MARX; ANDRADE; MAIA, 1997).

Figura 1: Piquiá (Fonte: Renan Chisté)

De acordo com Chiste e Mercadante (2012), a polpa do piquiá apresenta composição fitoquímica promissora para pesquisas de compostos bioativos com propriedades antioxidantes. Esses pesquisadores identificaram a composição e a capacidade antioxidante da polpa do piquiá, e encontraram que a água (52%) e os lipídeos (25%) são seus maiores componentes. Os autores também reportaram que o valor energético total é de 291 kcal/100 g. A capacidade antioxidante da polpa do piquiá, avaliada *in vitro* pelo método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*),

foi de 3,74 mmol Trolox/100g, o que é considerado um alto valor quando comparado com a média reportada de outras frutas (2,7 mmol Trolox/100 g) como por exemplo o murici (*Byrsonima crassifolia*) (2,65 mmol Trolox/100 g) e o ingá-cipó (*Inga edulis*) (2,34 mmol Trolox/100 g). Também foi determinado nesse mesmo trabalho que a polpa do piquiá é uma fonte rica em compostos fenólicos e flavonoides totais.

Uma vez que a polpa do piquiá é parte da dieta da população amazônica, estudos sobre seus possíveis efeitos biológicos podem fornecer importantes conhecimentos para o consumo deste alimento *in natura* e a comercialização desse fruto pela indústria de alimentos. Além disso, a avaliação da genotoxicidade é importante para estabelecer a segurança do consumo desse fruto. Como a polpa do piquiá é rica em compostos fenólicos e flavonoides e possui atividade anti-radical livre, a investigação do possível efeito antígeno-tóxico do piquiá também torna-se relevante.

Considerando que humanos consomem a polpa dos frutos e não seus extratos ou seus compostos bioativos isolados, o tratamento com a polpa liofilizada simula com precisão os possíveis efeitos biológicos dos compostos presentes na polpa após sua ingestão. Por outro lado, os produtos naturais precisam ser processados, preservados e/ou extraídos (CHEMAT; ZILL E; KHAN, 2011) para sua comercialização e aplicação nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e/ou químicas. Por isso, os efeitos *in vivo* da polpa liofilizada do piquiá e também do seu extrato etanólico foram avaliados neste estudo.

No presente trabalho, os efeitos genotóxicos e antígeno-tóxicos avaliados pelo teste do micronúcleo e cometa, as dosagens das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) e da glutathione reduzida (GSH) e a modulação da expressão de mRNA dos genes epóxido hidrolase 2 (*Ephx2*) e proteína tumoral p53 (*Tp53*) foram avaliados *in vivo*, após tratamento com a polpa liofilizada do piquiá ou com seu extrato etanólico.

1.2 Doxorrubicina

Para a avaliação dos possíveis efeitos protetores da polpa do piquiá, foi escolhida a doxorrubicina (DXR) como controle positivo, ou seja, como agente indutor de danos ao DNA, uma vez que esse fármaco é frequentemente empregado

em investigações que utilizam biomarcadores de danos no genoma (AISSA et al., 2012; ALEISA et al., 2007; ANTUNES; TAKAHASHI, 1998; RIBEIRO et al., 2010). Além disso, os antioxidantes têm sido usados para diminuir as espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) geradas pela DXR, sem reduzir a eficácia desse antitumoral nas células cancerosas, e inibir os danos no DNA induzidos pela DXR nas células saudáveis (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010).

A DXR é um fármaco produzido por uma variante do *Streptomyces peucetius* (var. *caesius*) pertencente à classe das antraciclinas de classe I não seletivas, que inibem tanto a síntese de DNA, quanto de RNA. Possui um amplo espectro de atividade antitumoral e é amplamente utilizada no tratamento de linfomas, leucemias, cânceres de mama, pulmão, ovário e de estômago e também nas malignidades da tireoide (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010; MINOTTI et al., 2004). O uso da DXR no tratamento do câncer teve início na década de 60 e ainda é incluída na maioria dos protocolos de quimioterapia, devido à sua elevada eficácia (LUDKE et al., 2009).

No plasma, aproximadamente 50-80% da DXR se encontra ligada a proteínas e possui um volume de distribuição (V_d) variando entre 500-800 L/m². Os níveis sanguíneos de DXR caem rapidamente, devido à sua distribuição para os tecidos, e sua alta penetração e retenção nas células nucleadas tem sido atribuída à sua lipofilicidade e capacidade de ligação ao DNA. A DXR penetra nas células através de difusão passiva e seu acúmulo intracelular resulta em concentrações que são de 10 a 500 vezes maiores que os níveis extracelulares (LAL et al., 2010). No meio intracelular, as concentrações nucleares da DXR são 50 vezes maiores do que no citoplasma (atingindo 340 μ M de saturação), o que representa uma molécula intercalada a cada 5 pares de bases do DNA, enquanto que a concentração de DXR livre é muito baixa (0,2% do total intracelular) e se encontra distribuída de forma heterogênea, devido ao sequestro em organelas como lisossomos, mitocôndrias e complexo de Golgi (DANESI et al., 2002; PETERSON; TROUET, 1978; ZUNINO et al., 1972). A DXR não atravessa a barreira hematoencefálica. Sua biotransformação ocorre principalmente no fígado, pela redução específica da cetona no C-13 produzindo doxorubicinol, um 13-dihidroderivado com um agrupamento hidroxila. O *clearance* da DXR é predominantemente mediado pelo caminho hepato-biliar, com

mais de 50% do fármaco excretado pela bile, sendo baixa sua excreção renal (aproximadamente 12%) (LAL et al., 2010).

Os efeitos antineoplásicos da DXR resultam em citotoxicidade e inibição da proliferação celular, atribuídos a sua ação em múltiplos alvos moleculares incluindo enzimas nucleares como as topoisomerases I e II (TEWEY et al., 1984). Os danos ao DNA mediados pela DXR por meio da inibição da topoisomerase II resultam em parada do ciclo celular nas fases G1 e G2 e indução de apoptose (BUCHHOLZ et al., 2002). A DXR também intercala com a molécula de DNA, inibindo a DNA e RNA polimerases, causando diminuição da replicação do DNA e da transcrição (TACAR; SRIAMORNSAK; DASSA, 2012). Os efeitos adversos da DXR incluem a intercalação com a molécula de DNA, levando à inibição da síntese de macromoléculas e geração de radicais livres, resultando em danos ao DNA ou peroxidação lipídica, ligação ao DNA e alquilação, *cross-linking* e interferência com a separação das fitas de DNA e com a atividade da helicase (GEWIRTZ, 1999; MINOTTI et al., 2004).

O uso clínico da DXR, assim como ocorre com outros agentes antitumorais, é limitado pelo aparecimento de graves efeitos adversos, como a toxicidade nos tecidos normais, e também pela resistência adquirida pelas células cancerosas (CARVALHO et al., 2009). Sua principal limitação clínica é a toxicidade cardíaca aguda e crônica, além de exercer efeito acumulativo com o tratamento. Acredita-se que o mecanismo responsável pela cardiotoxicidade esteja relacionado à indução de estresse oxidativo, resultando em lesões letais nos miócitos cardíacos (OCTAVIA et al., 2012). A forma aguda de cardiotoxicidade induzida pela DXR manifesta-se poucos minutos após o tratamento com o antitumoral e é caracterizada pela diminuição da contratilidade e subsequente hipotensão (JAIN, 2000).

Os aumentos da expressão de óxido nítrico sintetase (NOS – *Nitric Oxide Synthase*) e de nitrotirosina, um marcador de espécies reativas de nitrogênio (RNS – *Reactive Nitrogen Species*), tem sido encontrados em cardiomiócitos após exposição a DXR (MIHM et al., 2002; WEINSTEIN; MIHM; BAUER, 2000). O mecanismo proposto para explicar a cardiotoxicidade induzida pela DXR envolve a geração de radicais livres como o óxido nítrico, ânions superóxido e peroxinitrito. Inicialmente, a DXR aumenta a produção de ânions superóxido pelas mitocôndrias dos cardiomiócitos, e conseqüentemente, ocorre aumento da geração de outros

radicais livres e também aumento das produções de NOS e óxido nítrico (NO). O NO reage com os ânions superóxido formando peroxinitrito, o qual induz danos celulares através de peroxidação lipídica, inativação de enzimas e ativação de vias de sinalização de estresse. Na mitocôndria, o peroxinitrito e outros radicais livres, causam um evento persistente de geração de estresse oxidativo, levando à liberação de fatores pró-apoptóticos (como o citocromo c e fatores indutores de apoptose) e mediando caminhos de morte celular dependente e independente de caspases. O peroxinitrito também causa quebras nas fitas do DNA, ativando enzimas nucleares, como a PARP-1 (*Poly ADP ribose polymerase*). A superexpressão de PARP, uma proteína envolvida principalmente no reparo do DNA e na morte celular, inicia um ciclo de consumo de energia, resultando em rápida depleção de NAD^+ e ATP intracelulares, levando à disfunção celular e, consequentemente, morte celular por necrose (MUKHOPADHYAY et al., 2009).

Uma vez que o principal mecanismo responsável pela toxicidade da DXR é a indução de estresse oxidativo, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar se os antioxidantes podem diminuir os efeitos cardiotóxicos desse quimioterápico. O flavonoide hesperetina, encontrado principalmente em frutas cítricas (TRIVEDI et al., 2011), e os polifenóis de extratos do própolis (BOUTABET et al., 2011) e de extratos da semente e da casca da uva (YALCIN et al., 2010) demonstraram efeitos protetores sobre a cardiotoxicidade e o estresse oxidativo induzidos pela DXR em coração de ratos e camundongos. Além dos efeitos antioxidantes, a hesperetina e o extrato da semente e casca de uva também reduziram a genotoxicidade induzida pela DXR em células cardíacas e na medula óssea, respectivamente.

1.3 Ensaios de genotoxicidade e antigenotoxicidade

As avaliações dos efeitos genotóxicos e antigenotóxicos podem ser realizadas usando diferentes ensaios. Dentre eles, o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo (MN) são bastante empregados (AISSA et al., 2012; BOEIRA et al., 2010; GROVER et al., 2009; RIBEIRO et al., 2010) e internacionalmente aceitos pelas agências regulatórias (ROTHFUSS et al., 2011). O ensaio do cometa (eletroforese em gel de célula única) é um procedimento rápido e sensível para

quantificar danos no DNA em células de mamíferos (ROTHFUSS et al., 2011; SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000). Nesse ensaio, as células são embebidas em agarose, lisadas em tampão alcalino e submetidas a uma corrente elétrica. Os fragmentos de DNA quebrados migram a partir do DNA intacto do núcleo e, dessa forma, a extensão dos danos pode ser medida pelo comprimento da migração (Figura 2) (TICE et al., 2000).

Figura 2: Fotomicrografias de nucleoides de células do coração de ratos Wistar. (a) nucleoide sem dano e (b) nucleoide com dano. Coloração: Brometo de etídio. Microscópio de fluorescência, aumento de 400×. Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP/USP, 2011 (Fonte: Acervo pessoal)

Comparado com outros ensaios de genotoxicidade, as vantagens da técnica do cometa são: (1) alta sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA; (2) detecta danos ao DNA do tipo quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, pontes entre DNA-DNA e DNA-proteína; (3) habilidade para detectar danos em células que não se dividiram; (4) requer pequeno número de células por amostra; (5) baixo custo; (6) fácil aplicação e (7) é necessário um tempo relativamente curto para completar um experimento (TICE et al., 2000). A versão *in vivo* do teste vem sendo amplamente utilizada e pode ser aplicada em vários tipos de tecidos e células, sendo o fígado (órgão principal de metabolização de compostos) o mais recomendado (HARTMANN et al., 2003; TICE et al., 2000).

O teste do MN em roedores é bastante utilizado para a detecção de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e aneugênicos, que interferem nas fibras do fuso. Seu resultado fornece fortes evidências da mutagenicidade sistêmica do composto químico avaliado sob condições experimentais apropriadas. O

micronúcleo se expressa em células em divisão, como resultado de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou como consequência de cromossomos inteiros que não se prenderam ao fuso de divisão. Na telófase, estes fragmentos ou cromossomos inteiros são encapsulados em um pequeno núcleo, e são encontrados no citoplasma separados do núcleo principal (Figura 3). Durante a maturação das células da linhagem eritrocitária na medula óssea, o núcleo principal é expelido do eritrócito nucleado, enquanto os MNs ficam retidos. Estes pequenos núcleos são analisados em eritrócitos policromáticos (PCEs, eritrócitos jovens) tanto na medula óssea quanto no sangue periférico (Figuras 3 e 4) (RIBEIRO, 2006).

Os MNs são tipicamente arredondados, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito e correspondem ao que se denomina, em hematologia, de Corpúsculos de Howell-Jolly (RABELLO-GAY; RODRIGUES, 1991). Na medula óssea, avalia-se também a relação PCE/NCE (NCE – eritrócito normocromático). A diminuição na proporção de eritrócitos imaturos (PCE) reflete em uma diminuição na relação PCE/NCE, sendo considerado, portanto, um parâmetro de citotoxicidade ou depressão celular (RIBEIRO, 2006).

Figura 3: Fotomicrografia de eritrócitos normocromático (NCE) e policromático (PCE) de medula óssea de rato Wistar. A seta indica micronúcleo em PCE. Coloração: Giemsa. Microscopia de luz, aumento de 1000×. Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP/USP, 2011 (Fonte: Lívia Cristina Hernandes)

Figura 4: Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos (PCEs) de sangue periférico de rato Wistar. A seta indica micronúcleo. Coloração: Laranja de acridina. Microscopia de fluorescência, aumento de 1000×. Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP/USP, 2011 (Fonte: Lívia Cristina Hernandes)

1.4 Biomarcadores de estresse oxidativo

Dentre os mecanismos relacionados com a genotoxicidade e antigenotoxicidade estão a indução de estresse oxidativo (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003) e a ação antioxidante (BHATTACHARYA, 2011), respectivamente. Dessa forma, foi avaliado no presente trabalho as dosagens bioquímicas das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) e da glutatona reduzida (GSH) nos tecidos hepático, renal e cardíaco.

A peroxidação lipídica é o resultado do ataque dos radicais livres com a camada de lipídeos poliinsaturados das membranas celulares, resultando posteriormente em peroxidação de proteínas, perda ou enfraquecimento da estrutura e da função da membrana celular, além da geração de produtos de aldeído tais como acroleína, crotonaldeído, malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Embora em baixas concentrações esses aldeídos tenham importantes funções fisiológicas, como proliferação, transformação e diferenciação celulares e apoptose, altas concentrações desses compostos podem ser prejudiciais para todos os componentes celulares. O MDA e o HNE, quantificados por meio do teste de TBARS, são os principais produtos da peroxidação lipídica e várias são as consequências dos efeitos desses compostos nas células, sendo os mais conhecidos a interação com os ácidos nucleicos, as mutações, a modificação de

proteínas e as alterações na transcrição gênica e na sinalização celular (KARIHTALA; SOINI, 2007; WINCZURA; ZDZALIK; TUDEK, 2012).

O organismo está constantemente exposto ao ataque dos radicais livres, os quais podem surgir de processos endógenos ou do ambiente e, por isso, os sistemas biológicos utilizam-se das defesas antioxidantes de forma a proteger-se de possíveis danos celulares. Por definição, pode ser denominado como antioxidante qualquer molécula que inibe ou minimiza o processo de oxidação (KARIHTALA; SOINI, 2007). No organismo existem vários mecanismos e enzimas antioxidantes. Dentre eles, a glutathiona reduzida (GSH), usada como substrato pela enzima glutathiona peroxidase (GPx), está envolvida na redução de radicais hidroperóxidos, incluindo hidroperóxidos lipídicos. Além disso, reações com GSH representam o mecanismo mais rápido e efetivo para neutralizar o HNE nas células. Nesse processo, a enzima glutathiona S-transferase catalisa a conjugação dos HNEs com a GSH (KARIHTALA; SOINI, 2007; WINCZURA; ZDZALIK; TUDEK, 2012).

O estresse oxidativo é definido como o aumento na produção de radicais livres combinado com a diminuição das defesas antioxidantes (VALKO et al., 2007; WINCZURA; ZDZALIK; TUDEK, 2012). Por isso, quantificar as concentrações das enzimas e/ou proteínas antioxidantes e avaliar os efeitos dos radicais livres sobre as moléculas celulares são meios indiretos de avaliação do estresse oxidativo e podem ser chamados genericamente de biomarcadores de estresse oxidativo.

1.5 Genes epóxido hidrolase 2 (*Ephx2*) e proteína tumoral p53 (*Tp53*)

Além dos efeitos genotóxicos ou antigenotóxicos, a nutrição também pode exercer impacto na saúde por afetar diretamente a expressão gênica (FENECH et al., 2011). Desta forma, também foi investigado neste trabalho o efeito do tratamento com a polpa do piquiá e com seu extrato etanólico sobre a transcrição dos genes *Ephx2* e *Tp53*. O gene *Ephx2* (*Epoxide hydrolase 2*) codifica a enzima epóxido hidrolase solúvel (sEH – *Soluble Epoxide Hydrolase*) e está localizado no cromossomo 8 (8p21-12) em humanos (LARSSON et al., 1995) e no cromossomo 15 (15p12) em ratos (GENE DATABASE). A enzima sEH hidrolisa os ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs – *Epoxy Eicosatrienoic-acids*) a seus ácidos derivados dihidroxi-eicosatrienoicos (DHETs – *Dihydroxy Eicosatrienoic Acid Derivates*), que

possuem menor função biológica que os EETs. Os ácidos EETs são derivados do metabolismo do ácido araquidônico, possuem atividade antioxidante e são importantes moléculas sinalizadoras com funções na biologia cardiovascular, renal, resposta inflamatória e dor (ABOUTABL et al., 2011; TANAKA et al., 2008).

Em humanos e roedores, o gene *Ephx2* tem expressão em diversos órgãos e tecidos como fígado, rim, pulmão, coração, intestino, cérebro, placenta, bexiga, próstata, testículos, pele, baço, ovário, endotélio vascular e tecido muscular, entretanto, a atividade da enzima sEH é maior em fígado e rim. Embora a distribuição tecidual da enzima sEH tenha sido descrita na literatura, os mecanismos moleculares envolvidos na sua regulação ainda não são completamente conhecidos (TANAKA et al., 2008). A inibição seletiva da enzima sEH resulta em aumento dos ácidos EETs, os quais são um alvo emergente para o tratamento farmacológico de doenças cardiovasculares. Os polimorfismos do gene *Ephx2* e seus impactos na atividade catalítica da sEH tem sido relacionados com diversas doenças cardiovasculares (ZHAO et al., 2012). Zordoky et al. (2010) encontraram níveis baixos de EETs, aumento da expressão de mRNA do gene *Ephx2* e aumento da atividade da enzima sEH no coração de ratos tratados com a DXR em comparação com o grupo controle, sugerindo a associação entre o aumento da expressão do gene *Ephx2* nos miócitos cardíacos e a cardiotoxicidade induzida pelo quimioterápico. Os autores concluíram que as alterações na expressão do gene *Ephx2* e da enzima sEH poderiam representar um novo mecanismo responsável pela cardiotoxicidade progressiva durante a quimioterapia com a DXR.

O gene *Tp53*, também conhecido como gene supressor tumoral p53, codifica a proteína tumoral p53 e está localizado no cromossomo 17 (17p13.1) em humanos e no cromossomo 10 (10q24) em ratos (GENE DATABASE). Esse gene possui importante papel na manutenção da estabilidade genômica através de suas funções de reparo do DNA, promoção dos *checkpoints* do ciclo celular e indução da apoptose (HANEL; MOLL, 2012). Dependendo dos níveis celulares, a proteína p53 pode funcionar como oxidante ou como antioxidante. Sob condições fisiológicas normais, baixas concentrações de p53 participam das defesas antioxidantes aumentando a expressão de genes antioxidantes, como glutathiona peroxidase e superóxido dismutase 2, e suprimindo a formação de ROS. Por outro lado, altas

concentrações dessa proteína induz o acúmulo de ROS em resposta ao estresse oxidativo (VURUSANER; POLI; BASAGA, 2012).

Os mecanismos envolvidos com a toxicidade da DXR são complexos, e entre eles, a via intrínseca da apoptose celular dependente de p53 tem sido bastante estudada (AROLA et al., 2000; XIAO et al., 2012). Ativação do gene *Tp53* pode diretamente modular a família dos genes Bcl-2, levando a despolarização do potencial mitocondrial e consequente liberação de citocromo c para o citosol (ODA et al., 2000; XIAO et al., 2012). Estudos têm demonstrado que os efeitos adversos causados pela DXR podem ser mediados pela proteína p53 (VURUSANER; POLI; BASAGA, 2012) e que o pré-tratamento com antioxidantes diminui a expressão do gene *Tp53* induzida pela DXR (DAS et al., 2011; PATEL et al., 2010; XIAO et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são: Avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e antigenotóxicos, dosar as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a glutathiona reduzida (GSH) e investigar a modulação da expressão de mRNA dos genes *Ephx2* e *Tp53* em diferentes tecidos de ratos tratados com a polpa liofilizada do piquiá ou com seu extrato etanólico, associado ou não ao antitumoral doxorubicina.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e antigenotóxicos da polpa liofilizada do piquiá e de seu extrato etanólico, utilizando o ensaio do cometa em fígado, rim e coração de ratos Wistar;
- ✓ Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos, mutagênicos e antimutagênicos da polpa liofilizada do piquiá e de seu extrato etanólico, usando o teste do micronúcleo em medula óssea e em sangue periférico de ratos;
- ✓ Investigar os efeitos do tratamento com a polpa liofilizada do piquiá e com o seu extrato etanólico sobre as concentrações bioquímicas de TBARS e GSH em fígado, rim e coração de ratos;
- ✓ Investigar o efeito do tratamento com a polpa liofilizada do piquiá e com o seu extrato etanólico sobre a expressão de mRNA dos genes *Tp53* e *Ephx2* em fígado, rim e coração de ratos.
- ✓ Determinar e caracterizar os compostos fenólicos e carotenoides presentes na polpa liofilizada do piquiá e no seu extrato etanólico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Piquiá (*Caryocar villosum*)

As preparações da polpa liofilizada do piquiá e do seu extrato etanólico, assim como a caracterização química e a determinação de seus compostos fitoquímicos (CHISTE et al., 2012; CHISTE; MERCADANTE, 2012), foram realizadas na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas pelo Dr. Renan Campos Chisté e pela Prof^a. Dr^a. Adriana Zerlotti Mercadante. Diferentes extrações da polpa do piquiá foram preparadas usando os seguintes solventes: água; etanol/água (1:1, v/v); etanol; etanol/acetato de etila (1:1, v/v) e acetato de etila. A extração que apresentou maior concentração de compostos fenólicos foi do solvente água/etanol (1:1, v/v) (CHISTE et al., 2012), e por isso, foi o extrato utilizado nos ensaios *in vivo*.

3.1.1 Preparo da polpa liofilizada

O piquiá (*Caryocar villosum*) foi adquirido em março de 2010 no mercado “Ver-O-Peso”, Belém, Pará, Brasil. Os frutos maduros (9 kg) foram cortados ao meio e as cascas foram manualmente removidas. A polpa, de coloração amarelada, foi separada das sementes, pesada, triturada e imediatamente encaminhada para liofilização. A polpa liofilizada foi homogeneizada, embalada a vácuo, armazenada a -20 °C (CHISTE; MERCADANTE, 2012) e protegida de luminosidade até o momento da realização dos experimentos.

Para ser administrada aos animais, a polpa liofilizada foi adicionada em veículo apropriado (25% de óleo mineral + água). Essa suspensão foi preparada diariamente e imediatamente antes de cada gavagem, sendo que todos os grupos de tratamento receberam o mesmo lote da polpa.

3.1.2 Preparo do extrato etanólico da polpa do piquiá

Foram realizadas extrações em diferentes dias (triplicata) utilizando etanol:água (1:1, v/v) como solvente. Foram pesados 5 g de polpa de piquiá

liofilizada, adicionado 40 mL de solvente (1:8, m/v), agitado em shaker (168 rpm) por 16 horas à temperatura ambiente, e protegidos de luminosidade. Após o período de extração, o extrato líquido foi filtrado à vácuo, transferido para balão volumétrico de 50 mL e completado com etanol:água (1:1, v/v). Após aferir o volume final dos extratos brutos, estes foram congelados em nitrogênio líquido para posterior liofilização. Após liofilização, os extratos funcionais liofilizados foram transferidos para frascos protegidos de luminosidade, pesados, vedados e armazenados em freezer a -20 °C (CHISTE et al., 2012).

Para administração aos animais, o extrato foi dissolvido em água, diariamente e imediatamente antes de cada gavagem, sendo que todos os grupos foram tratados com o mesmo lote do extrato.

3.1.3 Determinação dos compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos e carotenoides da polpa liofilizada do piquiá

As determinações dos compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos e carotenoides na polpa liofilizada do piquiá foram realizadas de acordo com Chiste e Mercante (2012), descritas a seguir:

Todos os compostos fenólicos foram extraídos a partir de 5 g da polpa liofilizada congelada com metanol:água (8:2, v/v), quantificados usando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999) e o resultado foi expresso em miligrama de equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 g de polpa liofilizada. As concentrações totais de flavonoides foram quantificadas pelo ensaio colorimétrico descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999) e o resultado foi expresso em miligrama equivalente de catequina (CE) por 100 g de polpa liofilizada. Os taninos foram quantificados de acordo com o método descrito por Brune, Hallberg e Skånberg (1991) (taninos hidrolisáveis) e Waterman e Mole (1994) (taninos condensados), sendo os resultados expressos em miligrama equivalente de ácido tânico (TAE) por 100 g de polpa liofilizada.

As concentrações finais de carotenoides foram quantificadas de acordo com De Rosso e Mercadante (2007) com algumas modificações. Resumidamente, os carotenoides foram extraídos com acetona a partir de 5 g de polpa liofilizada, e o óleo foi removido fisicamente por causa do seu alto conteúdo na polpa do piquiá,

como a seguir: antes da transferência do éter, o carotenoide extraído foi mantido no freezer (temperatura < -36°C) por 2 h, seguido de filtração usando vidraria fria e lavado com acetona fria. Após extração, o extrato foi transferido para procedimento de partição com éter de petróleo:éter etílico (1:2 v/v), saponificado *overnight* a temperatura ambiente com 10% de KOH metanólico, transferido para outra partição e concentrado em evaporador rotativo ($T < 38^{\circ}\text{C}$) sob vácuo. O conteúdo de carotenoide total foi calculado usando o coeficiente específico de extinção de zeaxantina em etanol ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (DAVIES, 1976) e expresso como miligrama de carotenoide por 100 g de polpa liofilizada. Todos os experimentos foram feitos em triplicata, e o desvio padrão relativo foi menor do que 5%.

3.1.4 Determinação dos compostos fenólicos e carotenoides totais do extrato da polpa liofilizada do piquiá

As determinações dos compostos fenólicos e carotenoides totais no extrato etanólico da polpa do piquiá foram realizadas de acordo com Chiste *et al.* (2012) e estão descritas a seguir:

Os compostos fenólicos totais foram determinados através do método colorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). Para extração dos compostos fenólicos totais, foram pesados 0,1 g de extrato em tubos de ensaio, adicionado 1 mL da solução metanol:água (8:2, v/v) e extraído em ultrassom por 5 minutos a 25 °C. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 2683 x g por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para balão volumétrico de 5 mL. Este procedimento foi repetido cinco vezes. Os extratos hidrometanólicos foram armazenados a -36 °C e novamente centrifugados (2683 x g) no momento da análise. Para análise, uma alíquota de 1 mL foi retirada do extrato hidrometanólico ou das soluções padrões de ácido gálico (50, 100, 150 200, 250, 300 mg/L) e transferida para balão volumétrico de 25 mL contendo 9 mL de água destilada, adicionado 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu e a mistura agitada. Após 5 min foram adicionados 10 mL de solução de Na_2CO_3 7% e o volume imediatamente completado com água destilada. Após 90 min de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 750 nm. A solução utilizada como branco foi obtida da mesma forma, com relação idêntica de

metanol:água utilizada no preparo do extrato. Os resultados, obtidos em triplicata, foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato liofilizado.

Para a determinação dos carotenoides totais, foi necessário realizar extração exaustiva. Foram pesados 0,1 g de extrato em tubos de ensaio, adicionado 2 mL de acetona, agitados por 1 minuto em vórtex e finalmente centrifugado a $3864 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e o centrifugado novamente submetido ao procedimento de extração. Este procedimento foi realizado até remoção completa da coloração do extrato. Os extratos líquidos foram combinados e transferidos para o procedimento de partição em um funil de separação contendo éter de petróleo:éter etílico (1:2, v/v) e lavados com água destilada. Após a partição, os extratos foram evaporados em rota-evaporador ($T < 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) e re-suspendidos em etanol para posterior quantificação. O teor de carotenoides totais do extrato foi obtido através da lei de Lambert-Beer, utilizando o coeficiente de extinção específico da zeaxantina em etanol ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2540\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) (DAVIES, 1976) e os resultados, obtidos em triplicata, foram expressos em μg de carotenoides por g de extrato.

3.1.5 Caracterização e quantificação fitoquímica

A caracterização e quantificação fitoquímica da polpa liofilizada e do seu extrato etanólico foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquide Chromatography*) como descrito por Chiste e Mercadante (2012) e Chiste *et al.* (2012), respectivamente.

Os carotenoides, compostos fenólicos, ácido ascórbico, tocoferóis e tocotrienóis do extrato etanólico e da polpa liofilizada do piquiá foram analisados em triplicata em HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão), o qual foi equipado com bombas quaternárias (LC-20AD), uma unidade desgaseificadora (DGU-20A5), uma válvula de injeção Rheodyne com uma alça de $20\text{ }\mu\text{L}$ conectada em série a um detector de arranjos de diodos (DAD) (SPD-M20A) e espectômetro de massa (MS) da Bruker Daltonics (modelo Esquire 4000, Bremen, Alemanha) com analisador ion-trap. Uma interface de ionização química a pressão atmosférica (APCI) foi usada no modo positivo para carotenoides e a fonte de ionização de electrospray (ESI) foi usada para compostos fenólicos.

Para a análise dos carotenoides, uma alíquota do extrato final, obtida a partir da determinação dos carotenoides totais, foi evaporada sob fluxo de N₂, dissolvida em MeOH:MTBE (70:30, v/v) e injetada no sistema de cromatografia. Os carotenoides foram separados numa coluna C₃₀ YMC (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) usando um gradiente linear de MeOH:MTBE como fase móvel de 95:5 para 70:30 em 30 min, seguido de 50:50 em 20 min de acordo com o procedimento de quantificação e identificação através de HPLC-DAD-APCI-MS/MS de carotenoides previamente descrita por De Rosso e Mercadante (2007). Os padrões usados na identificação dos carotenoides foram: all-trans-β-caroteno, all-trans-luteína, all-trans-zeaxantina, 9-cis-neoxantina, all-trans-violaxantina e all-trans-anteraxantina. As porcentagens de carotenoide obtidas pelo HPLC-DAA, em triplicata, foram calculadas considerando a área de todos os principais picos separados.

Para os compostos fenólicos, uma alíquota do extrato final, obtida a partir da determinação dos compostos fenólicos totais, foi utilizada antes da reação de Folin-Ciocalteu e analisada pelo método descrito acima (HPLC-DAD-MS). Os compostos fenólicos foram separados numa coluna C₁₈ Synergi Hydro (4 µm, 250 x 4.6 mm, Phenomenex) a 0,9 mL/min com a coluna a 29°C, e uma fase móvel consistindo de água:ácido fórmico (99,5:0,5, v/v) (solvente A) e acetonitrila:ácido fórmico (99,5:0,5, v/v) (solvente B) em gradiente linear de A:B 99:1 para 50:50 em 50 min; em seguida de 50:50 para 1:99 em 5 min. Essa última relação (1:99) foi mantida por mais 5 min. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 271 nm. A coluna eluída foi dividida para permitir apenas 0,15 mL/min para entrar a interface ESI. Os espectros de massa foram adquiridos com uma ampla varredura de 100 a 800 *m/z*, onde, os parâmetros MS estavam em série como a seguir: fonte ESI em modos positivo e negativo, voltagem de capilaridade a 2000 V, placa final compensada a -500 V, saída da capilaridade a -110 V, skimmer 1 a 10 V, skimmer 2 a 5 V, temperatura do gás seco (N₂) a 310 °C, taxa de fluxo a 5L/min, nebulizador a 30 psi, e a energia de fragmentação MS/MS a 1,4 V. Os compostos fenólicos foram identificados com base nas informações a seguir: ordem de eluição e tempo de retenção dos picos em relação aos padrões da coluna na fase reversa, UV-visível e características do espectro de massa comparado com padrões analisados nas mesmas condições e dados disponíveis na literatura. Os padrões usados na identificação dos compostos fenólicos foram: catequina, epicatequina,

ácido quínico, rutina, taxifolina, naringina, hesperidina, neo-hesperidina, luteolina, quercetina, naringenina, apigenina, ácido gálico, ácido elágico, ácido hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido 4-cumárico, ácido ferúlico, miricetina e kaempferol. As porcentagens dos compostos fenólicos obtidas por HPLC-DAD, em triplicata, foram calculadas considerando a área de todos os maiores picos separados.

O ácido ascórbico foi extraído a partir de 3 g de polpa liofilizada do piquiá com uma solução aquosa de 1% de ácido oxálico e quantificado por HPLC-DAD após separação em coluna C₁₈ Shim-pack (5µm, 250 x 4.6 mm, Shimadzu, Kyoto, Japão) com uma fase móvel isocrática contendo solução de ácido sulfúrico com pH 2,5-0,7 mL/min e uma coluna a temperatura de 25°C, como descrito por de Souza et al. (2004).

Os conteúdos de tocoferol e tocotrienol foram analisados de acordo com American Oil Chemists' Society (AOCS) (2004) utilizando sistema de HPLC de fase normal (Perkin Elmer, Waltham, MA). Após a diluição do óleo da polpa liofilizada do piquiá, a extração foi realizada de acordo com Bligh e Dyer (1959) em hexano. O HPLCE Perkin Elmer consiste de uma bomba isocrática (Series 200) equipada com um espectrofluorômetro (Series 200a) acertado a 290 nm para excitação e 330 nm para emissão. Os tocoferóis e tocotrienóis foram separados na coluna LiChrosorb Si60 (5 µm, 250 x 4 mm, Hibar Fertigsaulle RT, Darmstadt, Alemanha) com fase móvel isocrática consistindo de hexano:isopropanol (99:1, v/v) a 1,0 mL/min.

3.2 Doxorrubicina

O antitumoral DXR (CAS 25136-40-9) foi utilizado na forma de Cloridrato de Doxorrubicina (Rubidox[®]), adquirido do Laboratório Bergamo (Taboão da Serra, São Paulo, Brasil, CAS 25136-40-9). A solução de DXR foi preparada imediatamente antes das administrações, na concentração de 2 mg/mL, sempre protegida da luz.

3.3 Animais e protocolo experimental

Este trabalho foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto, sob o número de protocolo

09.1.1151.53.3 (Anexo A – Certificado CEUA). Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, pesando em torno de 120g, com 4 a 5 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo alternado de luz/escuro de 12 horas e receberam água e ração (Nuvilab[®]) *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 12 grupos (n=6 animais/grupo) e o tratamento foi realizado diariamente por gavagem por 14 dias, com intervalos de 24 horas entre as doses. No 14º dia os animais receberam injeção intraperitoneal de solução salina (NaCl, 0,9%) ou DXR (15 mg/kg p.c), e 24 horas após essa administração foram submetidos a eutanásia (Figura 5). As doses foram 75, 150 e 300 mg/kg p.c para a polpa do piquiá e 75 mg/kg p.c. para o extrato etanólico. A polpa liofilizada do piquiá foi dispersa em óleo mineral (25%) + água e o extrato da polpa em água, tornando necessária a realização de dois controles diferentes: o grupo óleo mineral e o grupo controle água. Os grupos de tratamento foram os seguintes:

- Grupo controle água: os animais receberam água por gavagem e solução salina i.p.;
- Grupo óleo mineral: os animais receberam óleo mineral (25%) + água por gavagem e solução salina i.p.;
- Grupo extrato piquiá: os animais receberam o extrato do piquiá (75 mg/kg p.c) por gavagem e solução salina i.p.;
- Grupos piquiá: os animais receberam a polpa do piquiá, em uma das três diferentes doses (75, 150 ou 300 mg/kg p.c), por gavagem e solução salina i.p.;
- Grupo DXR: os animais receberam água por gavagem e injeção de DXR i.p.;
- Grupo óleo + DXR: os animais receberam óleo mineral por gavagem e injeção de DXR i.p.;
- Grupo extrato piquiá + DXR: os animais receberam o extrato do piquiá (75 mg/kg p.c.) por gavagem e injeção de DXR i.p.;
- Grupos piquiá + DXR: os animais receberam a polpa do piquiá, em uma das 3 diferentes doses (75, 150 ou 300 mg/kg p.c.), por gavagem e injeção de DXR i.p.

Considerando que um fruto do piquiazeiro apresenta uma média de 300 g de peso, a polpa contém aproximadamente 52% de água e corresponde a aproximadamente a 12% do peso total do fruto. Assim, extrapolando para consumo humano, para uma pessoa de 70 kg de peso corpóreo, as doses de 300, 150 e 75 mg/kg da polpa liofilizada do piquiá corresponderia a aproximadamente ao consumo de 1, $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ de fruto do piquiá, respectivamente.

Os animais foram pesados diariamente durante todo o experimento com o objetivo de detectar possíveis alterações no peso corpóreo devido aos tratamentos administrados.

O controle positivo utilizado nos experimentos foi o grupo DXR, tanto para a avaliação da polpa quanto do extrato do piquiá. Quanto ao controle negativo, utilizou-se tratamento com o solvente apropriado, ou seja: grupo óleo mineral para a avaliação da polpa e grupo controle água para avaliação do extrato.

Ao fim do tempo de tratamento, os animais foram anestesiados com hidratado de cloral 10% (4 mL/kg p.c., i.p.), o sangue da veia caudal coletado para o teste do MN e a seguir os animais foram eutanasiados por decapitação. As cavidades abdominal e torácica foram abertas e os rins, fígado e coração foram imediatamente removidos, pesados (para estabelecer a relação peso do órgão/peso corpóreo) e 0,4 g de cada tecido utilizado no teste do cometa. As amostras de tecidos de cada animal foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (-80°C) para posterior análise. A medula óssea foi coletada dos fêmures para o teste do MN.

Figura 5: Delineamento experimental

3.4 Ensaio do cometa em células de fígado, rim e coração

O ensaio alcalino do cometa foi realizado como descrito por Singh et al. (1988) de acordo com protocolo proposto por Tice et al. (2000):

Amostras de fígado, rim ou coração (0,4 g) foram coletadas ao final do experimento (15º dia), triturados usando tesoura e mantidos em 2mL de solução de Hanks. Em seguida, foi determinada a viabilidade celular por exclusão com azul de tripan 0,4% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos; CAS 72-57-1). As suspensões celulares (80 µL) do fígado, rim e coração foram adicionadas a 240 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos; CAS 9012-36-6) e espalhadas em lâminas pré-revestidas com agarose normal (1,5%) (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos; CAS 9012-36-6). As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por 15 min. A seguir, as lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em solução de lise recém-preparada contendo 2.5 M NaCl, 100mM EDTA, 10% DMSO, 1% Triton X-100 e 10 mM Tris (pH 10) por 22 horas a 4°C.

Após a lise, as lâminas foram mergulhadas em solução de eletroforese contendo 300 mM NaOH e 1 mM EDTA a pH>13 por 20 min para desnaturar o DNA. A eletroforese foi realizada por 20 min, em uma intensidade de campo elétrico de 0,78V/cm (25 V e 300 mA). Após o tempo da eletroforese, as lâminas foram imersas em tampão de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 5 min. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, fixadas em etanol por 2 min e armazenadas até o momento da análise. Imediatamente antes da análise as lâminas foram coradas com 30 µL de brometo de etídio (20 µL/mL) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos; CAS 1239-45-8). Os nucleóides gerados pela técnica foram analisados em microscópio de fluorescência Zeiss, usando filtro 515 – 560 nm e barreira de filtro de 590 nm, aumento de 400×. Foram fotografados 100 nucleóides aleatórios utilizando câmera AxioCan (Zeiss), *software* de captura de imagens AxioVision 3.1 (Zeiss) e analisados por *software* CometScore™ Freeware v1.5 (TriTek Corp., Sumerduck, VA, Estados Unidos). A porcentagem de DNA na cauda (intensidade da fluorescência na cauda dividida pela intensidade de fluorescência da cabeça do nucleóide) foi o parâmetro utilizado para medir os danos ao DNA. A porcentagem de redução no ensaio do cometa para os tratamentos com a polpa do piquiá associado com DXR foi calculada de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Waters et al. (1990), utilizando a fórmula:

$$\% \text{Redução} = \frac{\text{média do escore em A} - \text{média do escore em B}}{\text{média do escore em A} - \text{média do escore em C}} \times 100$$

Onde A é o grupo óleo + DXR (controle positivo), B é o grupo piquiá + DXR e C é o grupo óleo mineral (controle negativo).

3.5 Teste do micronúcleo (MN) em medula óssea e em sangue periférico de roedores

O teste do MN em medula óssea foi realizado segundo proposto por Schmid (1975). A medula óssea foi coletada dos fêmures com soro bovino fetal (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), a suspensão celular foi centrifugada a 900 rpm por 10 min, e do *pellet* foi realizado esfregaço em lâminas previamente limpas e secas.

Após secas em temperatura ambiente durante 24 horas, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos; CAS 51811-82-6) imediatamente antes da análise, que foi realizada em microscópio de luz, objetiva de imersão. Foram analisados 2.000 PCEs por animal e também a relação PCE/NCE no total de 500 eritrócitos por animal.

O teste do MN em sangue periférico foi realizado como descrito por Holden, Majeska e Studwell (1997). O sangue da veia caudal foi coletado 24 h após o último tratamento, depositado em lâminas previamente limpas e secas, nas quais foi feito um esfregaço e 24 horas após secarem em temperatura ambiente, foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos. As lâminas foram coradas com laranja de acridina (125 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos; CAS 10127-02-3) imediatamente antes da análise. A análise citogenética foi realizada em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, modelo Axiostar Plus), combinando luz azul (488nm) e filtro amarelo, objetiva de imersão. Foram analisados 1.000 PCEs por animal quanto à frequência de micronúcleos, segundo proposto por Hayashi et al. (1990) e Holden, Majeska e Studwell (1997).

A porcentagem de redução na frequência de células micronucleadas para os tratamentos com a polpa do piquiá associado a DXR foi calculado de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Waters et al. (1990), como descrito anteriormente.

3.6 Dosagem de GSH e TBARS em fígado, rim e coração de ratos

As concentrações de TBARS em tecidos hepático, renal e cardíaco de ratos foram determinadas de acordo com Buege e Aust (1978). Fígado, rim ou coração (100 mg) foram homogeneizados em 1 mL de solução de KCL 1,15%. Uma alíquota de 0,5 mL do homogeneizado foi adicionada a 1 mL de solução de reagente de ácido tiobarbitúrico (TBA) + ácido tricloracético (TCA) (TBA 3,7 g/L + TCA 50% em HCl 0,25 mol/L) e incubada por 15 min em banho fervente. Após resfriamento, as amostras foram centrifugadas e a absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (Micronal B580), em 535 nm. A curva padrão foi feita com 1,1,3,3 tetramethoxypropano em concentrações de 5,125;

10,25; 20,50 e 40,10 nmol/L (Figura 6a). Os resultados foram expressos em nmol de TBARS/mg proteína.

Para avaliar as concentrações de GSH, os homogeneizados descritos acima foram diluídos em água (1:4) e precipitados com TCA 50% e, em seguida, centrifugados a 3500 rpm por 10 min (SEDLAK; LINDSAY, 1968). 2,0 mL de tampão Tris-EDTA (0,2 M, pH 8,9) e 0,1 mL de DTNB foram adicionados a uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 15 min e, então, lidas em 412 nm utilizando curva padrão de α -cisteína nas concentrações de 0,10; 0,04; 0,02 e 0,01 μ mol/mL (Figura 6b). Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Lowry com as amostras lidas em 650 nm (HARTREE, 1972), usando albumina sérica bovina como padrão.

Figura 6: Curvas padrões de (a) 1,1,3,3 tetramethoxypropano e (b) α -cisteína

3.7 Expressão de mRNA dos genes *Ephx2* e *Tp53* por PCR em tempo real (RT-qPCR)

3.7.1 Extração de RNA total

A análise da expressão de mRNA foi realizada nos grupos tratados com as doses de 75 e 300 mg/kg p.c. da polpa do piquiá, uma vez que a menor dose apresentou efeitos antigenotóxicos no fígado e rim e também no teste do MN demonstrou maior redução da frequência de MN PCE, e no coração a maior dose apresentou efeitos protetores.

Após a eutanásia, amostras de rim, fígado e coração foram removidas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C. O RNA total foi extraído de um *pool* de tecidos proveniente de 6 animais por grupo. Cada *pool* foi submetido à extração do RNA total pelo método do Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), de acordo com o protocolo do fabricante; seguido por purificação usando o kit *SV Total RNA Isolation System*® (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).

3.7.2 Avaliação qualitativa e quantitativa do RNA total por espectrofotometria

A solução de RNA total (2 µL) foi diluída em água *nuclease free* (98 µL), e a seguir foi quantificado por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda UV de 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). A pureza das amostras foi verificada pela razão A_{260}/A_{280} , que mostra possíveis contaminações por proteínas e DNA; e pela razão A_{260}/A_{230} que mostra contaminação por sais e compostos orgânicos, como guanidina ou fenol. Amostras de RNA total com grau de pureza aceitável apresentam razões A_{260}/A_{230} entre 1,7 e 2,2 e A_{260}/A_{280} entre 1,7 e 2,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A quantificação e o grau de pureza do RNA total extraído do fígado, rim e coração estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Quantificação e grau de pureza ($A_{260/280}$ e $A_{260/230}$) do RNA total extraído de fígado, rim e coração de ratos Wistar

Grupos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Fígado			
Controle água	2987,2	1,86	1,91
Óleo Mineral	2921,5	1,99	2,12
Extrato piquiá 75 mg/kg	3926,8	1,87	1,84
Piquiá 75 mg/kg	2504,1	1,78	1,70
Piquiá 300 mg/kg	1240,1	1,76	1,89
DXR	2677,1	1,89	1,78
Óleo + DXR	4232,6	1,86	2,01
Extrato + DXR	2356,5	1,84	2,03
Piquiá 75 + DXR	1925,7	1,84	2,04
Piquiá 300 + DXR	2301,2	1,76	1,85
Rim			
Controle água	3160,3	2,00	2,15
Óleo Mineral	3939,3	1,85	1,90
Extrato piquiá 75 mg/kg	2940,1	2,00	2,09
Piquiá 75 mg/kg	3847,5	1,85	1,93
Piquiá 300 mg/kg	3841,7	1,84	1,89
DXR	2950,0	2,00	2,06
Óleo + DXR	2651,5	2,00	2,07
Extrato + DXR	3296,7	1,96	1,99
Piquiá 75 + DXR	3677,4	1,90	1,94
Piquiá 300 + DXR	3441,2	1,98	2,03
Coração			
Controle água	299,2	1,81	1,70
Óleo Mineral	461,3	1,88	2,03
Extrato piquiá 75 mg/kg	428,6	1,83	1,78
Piquiá 75 mg/kg	417,5	1,94	2,02
Piquiá 300 mg/kg	463,2	1,91	2,14
DXR	337,5	1,86	1,70
Óleo + DXR	518,8	1,87	1,80
Extrato + DXR	295,0	1,88	1,70
Piquiá 75 + DXR	803,0	1,86	2,16
Piquiá 300 + DXR	962,5	1,85	2,20

3.7.3 Avaliação da integridade do RNA total

A integridade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose (1%). A agarose foi fundida em tampão TAE (Tris-acetato 40mM e EDTA 1mM pH 8,0) diluído 50x, e à essa mistura foi adicionado 6 µL do corante GelRed (Biotium, Hayward, CA, Estados Unidos). Cada amostra aplicada no gel foi preparada com 1 µg de RNA total e *dye loading solution* (20%, v/v) (30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol). A eletroforese foi realizada a 80 V durante 90 min, e em seguida, visualizadas e fotografadas em foto-documentador UV (Molecular Imager® Gel Doc™ XR, Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). Como pode ser observado na figura 7, as amostras estavam íntegras e, portanto, satisfatórias para a realização dos experimentos.

Figura 7: Fotos de gel de agarose contendo RNA total de amostras de (a) fígado, (b) rim e (c) coração de ratos Wistar. As bandas predominantes no gel correspondem ao RNA ribossomal (RNAr) 28S e o RNAr 18S. A banda de menor intensidade corresponde ao RNAr 5S e RNA transportador. M: marcador de peso molecular (1 Kb); 1: grupo controle água; 2: grupo óleo mineral; 3: grupo extrato piquiá 75 mg/kg; 4: piquiá 75 mg/kg; 5: piquiá 300 mg/kg; 6: DXR; 7: óleo + DXR; 8: extrato piquiá 75 + DXR; 9: piquiá 75 + DXR; 10: piquiá 300 + DXR. Gel de agarose desnaturante 1% corado com GelRed e visualizado em foto-documentador UV

3.7.4 Síntese de cDNA

O RNA total foi submetido à reação de transcriptase reversa utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem, Foster, Estados Unidos), de acordo com o protocolo do fabricante, como descrito a seguir: O mix do kit *High Capacity* (10 µL de volume total: sendo 2 µL de tampão; 0,8 µL de 25X dNTPs; 2 µL de 10X *Random primers*; 1 µL da enzima transcriptase reversa; 0,5 µL de *RNase inhibitor* e 3,7 µL de água *nuclease free*) foi adicionado a 10 µL de solução de RNA, contendo 1 µg de RNA total, e a seguir foi incubado em termociclador (Mastercycle, Eppendorf) nas seguintes condições: 25 °C a 10 min; 37 °C a 120 min e 85 °C a 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer -20 °C por no máximo 1 semana.

3.7.5 Síntese dos *primers* e escolha dos genes de referência

Todos os *primers* foram selecionados e desenhados com auxílio dos *softwares* *PrimerQuest*SM (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>), *OligoAnalyzer* 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) e *Gene Runner* 3.05 (Hastings Software, Inc.) e foram sintetizados pela Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos). As sequências dos *primers*, bem como o comprimento da sequência amplificada (*amplicon*) de cada mRNA correspondente, estão apresentados na tabela 2. Todos os *primers* foram testados *in silico* quanto à possível formação de dímeros, estruturas secundárias e especificidades pelo BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).

Tabela 2: Sequência dos *primers* utilizados na RT-qPCR e comprimento dos fragmentos amplificados (*amplicon*)

	Primer forward (5' - 3')	Primer reverse (5' - 3')	Amplicon (pb)
<i>Rps29</i>	CTTCATTAAGTTGGACTAAGCG	GCAAAGACTAGCATGATTGGT	99
<i>Hprt1</i>	GTCCAGCGTCGTGATTAG	GAGCAAGTCTTTCAGTCCTG	138
<i>Ephx2</i>	GCAGTCCAAATGATGTCAGC	CCAGCTCTCAGGAAACCCAT	119
<i>Tp53</i>	GGCAGACTTTTCGGCACAG	GCGTGATGATGGTAAGGATG	144

Os genes *Rp29* (proteína ribossomal S29) e *Hprt1* (hipoxantina 1 fosforibosiltransferase) foram usados como genes de referência

Os genes de referência são importantes para a correta normalização da RT-qPCR. Se a escolha desses genes for incorreta, ou seja, se esses genes forem regulados pelas condições experimentais, pode acarretar em falsos resultados (HUGGETT et al., 2005). Por isso, 5 genes de referência foram avaliados no presente trabalho: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*Gapdh*), beta-actina (*Actb*), proteína ribossomal L4 (*Rpl4*), proteína ribossomal S29 (*Rp29*) e hipoxantina 1 fosforibosiltransferase (*Hprt1*). Entre esses genes, o *Gapdh* e *Actb* foram os que mais variaram com tratamento com a DXR, e os que apresentaram menores variações foram o *Rp29* e o *Hprt1* sendo, portanto, os genes de referência escolhidos.

3.7.6 Condições da RT-qPCR

As expressões relativas dos mRNAs dos genes *Ephx2* e *Tp53* foram avaliados por ensaios de RT-qPCR comparando os níveis de expressão entre os grupos tratados com os seus respectivos controles negativos. As reações foram realizadas utilizando o termociclador CFX96 (BioRad, Hercules, USA), kit Platinum[®] SYBR[®] Green (Invitrogen, Carlsbad, USA), placas contendo 96 poços (BioRad, Hercules, USA) e seguiram as seguintes condições: volume final de 13 µL/poço, sendo 7 µL de Platinum[®] SYBR[®] Green, 5 µL de amostra diluída de cDNA (10 ng/µL) e 0,5 µL de cada *primer* - na concentração final de 0,38 µM de cada *primer*. As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas com 3 replicatas técnicas.

3.7.7 Validação da RT-qPCR

A especificidade dos *primers*, a avaliação de contaminação por DNA genômico, a eficiência da reação e a validação dos experimentos são parâmetros críticos que garantem a qualidade dos resultados obtidos na RT-qPCR. Todos esses parâmetros seguiram as recomendações dos protocolos da Applied Biosystems (2004).

A análise da curva de dissociação, ou curva de *melting*, é um dos parâmetros importantes que garante a especificidade e a pureza dos produtos formados. A figura 8 mostra que as curvas de *melting* dos *primers* *Rp29*, *Hprt1*, *Ephx2* e *Tp53* apresentaram apenas 1 único pico, confirmando a ausência da formação de dímeros de *primers* ou de outros produtos inespecíficos.

Figura 8: Curvas de *melting* dos primers *Rp29*, *Hprt1*, *Tp53* e *Ephx2*. cDNA obtido de RNA total de rim de ratos Wistar do grupo controle óleo mineral. Quantidade de cDNA utilizada em cada poço: 50 ng. Concentração de cada primer: 0,38 μ M

Reações de RT-qPCR usando RNA total foram realizadas para avaliar possíveis contaminações com DNA genômico. Essas reações não apresentaram amplificações, indicando ausência de contaminação por DNA genômico em todas as amostras de RNA utilizadas. Também foram incluídos brancos para cada mix de *primer* + *syber green* em cada reação. A figura 9 mostra as curvas de amplificação dos primers *Rps29*, *Hprt1*, *Ephx2* e *Tp53* em amostras de cDNA de rim do grupo controle óleo mineral e também seus respectivos brancos, demonstrando que não houve contaminação do mix.

Figura 9: Curvas de amplificação dos primers *Rps29*, *Hprt1*, *Tp53* e *Ephx2* em amostras de rim de ratos Wistar do grupo controle óleo mineral. Quantidade de cDNA utilizado em cada poço: 50 ng. Concentração de cada primer: 0,38 μ M

A eficiência (E) da reação da RT-qPCR é calculada a partir do valor do *slope* da curva padrão, que é construída através dos valores de Cq (*quantification cycle*) *versus* o logaritmo da quantidade de cDNA. A eficiência da reação é a taxa na qual a amplificação da reação é gerada. Se a amplificação dobra em quantidade durante a fase geométrica da PCR, então o ensaio tem 100% de eficiência. O *slope* da curva padrão é calculado por meio da linha de regressão linear e a eficiência é calculada usando a fórmula: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. Os valores de eficiência entre 90% e 110%, e de coeficiente de correlação (R^2) entre 0,99 e 0,999 são considerados aceitáveis e garantem a boa qualidade da reação (RAYMAEKERS et al., 2009). A figura 10 mostra as curvas padrões e os valores da eficiência de cada *primer*.

Figura 10: Gráficos da regressão linear das curvas padrões dos *primers* (a) *Rps29*, (b) *Hprt1*, (c) *Ephx2* e (d) *Tp53*. Dentro de cada gráfico pode ser observado o coeficiente de correlação (R^2), o grau de inclinação de cada reta (*slope*) e a eficiência da reação (E). As quantidades de cDNA usadas foram: 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,12 ng e 1,56 ng

Segundo protocolos da Applied Biosystems (2004), o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o cálculo da expressão relativa de mRNA requer eficiências equivalentes entre o genes alvo e o gene de referência. Para determinar se duas reações de amplificação possuem a mesma eficiência verifica-se, através de curvas de regressão linear, como o ΔCq ($Cq_{\text{gene alvo}} - Cq_{\text{gene de referência}}$) varia com as diluições da amostra. Isso é também chamado de experimento de validação. Para passar no experimento de

validação, genes com eficiências equivalentes precisam apresentar valores absolutos de *slope* menores que 0,1. Se os *slopes* forem maiores que 0,1, o que significa que os genes não possuem eficiências equivalentes, pode-se calcular a expressão relativa usando outra fórmula matemática proposta por Pfaffl (2001). Nesse modelo não é necessário curvas de calibração nem que as eficiências dos diferentes primers sejam semelhantes, sendo preciso conhecer apenas as eficiências das reações. A equação matemática é:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta Cq_{\text{gene alvo}} (Cq_{\text{controle}} - Cq_{\text{amostra}})}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta Cq_{\text{gene referência}} (Ct_{\text{controle}} - Cq_{\text{amostra}})}}, \text{ onde:}$$

E: eficiência; gene alvo: gene de estudo; Cq_{controle} : Cq da amostra do grupo controle; Cq_{amostra} : Cq da amostra do grupo de tratamento.

Na figura 11 estão apresentados os experimentos de validação. Os valores de *slope* foram maiores que 0,1 (exceto entre *Ephx2* e *Rps29* que apresentaram *slope* de 0,083) indicando que as eficiências entre os genes não foram equivalentes. Dessa forma, o cálculo da expressão relativa dos mRNAs foram calculados usando o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001), como descrito acima.

Figura 11: Gráficos dos experimentos de validação. a) *Ephx2* e *Rps29*; b) *Ephx2* e *Hprt1*; c) *Tp53* e *Rps29* e d) *Tp53* e *Hprt1*. Dentro de cada gráfico pode ser observado o grau de inclinação de cada reta (*slope*). As quantidades de cDNA usadas foram: 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng e 3,12 ng. $\Delta Cq = Cq_{\text{gene alvo}} - Cq_{\text{gene de referência}}$

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e submetidos a análise de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados do ensaio do cometa, teste do MN, TBARS e GSH foram submetidos a análise de variância (One way ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Dunnett, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Os dados da expressão relativa dos mRNAs foram analisados pelo teste *t* de *student*, também utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os parâmetros avaliados.

Para a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade, os grupos tratados com a polpa do piquiá nas diferentes doses ou com o seu extrato etanólico foram comparados com os grupos óleo mineral ou controle água, respectivamente. Para a avaliação da antigenotoxicidade e antimutagenicidade, os grupos tratados com a polpa do piquiá associada a DXR ou com o seu extrato etanólico associado a DXR foram comparados com os grupos óleo + DXR ou DXR, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição fitoquímica da polpa liofilizada do piquiá

O cromatograma do HPLC-DAD representa os carotenoides (Figura 12a) e compostos fenólicos (Figura 12b) detectados na polpa liofilizada do piquiá. O conteúdo desses compostos e as porcentagens de seus principais constituintes estão mostrados na Tabela 3. A polpa do piquiá contém uma grande quantidade de compostos fenólicos e carotenoides totais (236,2 mg GAE/100 g e 6,9 mg equivalente de zeaxantina/100 g, respectivamente), e tocoferóis também foram observados. Entre os carotenoides, compostos fenólicos e tocoferóis encontrados, anteraxantina, ácido gálico e α -tocoferol foram os mais frequentes, respectivamente. Taninos condensados não foram detectados na polpa do piquiá, uma vez que nenhum precipitado se formou após a adição de albumina sérica bovina. Além disso, ácido ascórbico também não foi detectado.

Figura 12: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da polpa liofilizada do piquiá. (a) Carotenoides: 1: *all-trans*-neoxantina; 2: carotenoide não identificado; 3: *all-trans*-violaxantina; 4: *all-trans*-anteraxantina; 5: *all-trans*-luteína; 6: *all-trans*-zeaxantina; 7: *all-trans*- β -caroteno. (b) Compostos fenólicos: 1: monogaloil glicosídeo; 2: ácido gálico; 3: hexahidroxidifenoil glicosídeo; 4: ácido cumaroil quínico; 5: ácido elágico glicosídeo; 6: ácido elágico ramnosídeo; 7: ácido elágico; 8: metil quercetina di-glicosídeo

Tabela 3: Compostos fitoquímicos da polpa liofilizada do piquiá (base seca)

Compostos bioativos	Concentração (mg/100g) ^a	Compostos principais (%)
Carotenoides totais	6,9 ± 0,2	Anteraxantina (27%), carotenóide não identificado (22%), Zeaxantina (19%), Neoxantina (9%), Violaxantina (6%), β-caroteno (4%) e Luteína (3%)
Compostos fenólicos totais	236,2 ± 0,6 ^b	Ácido gálico (31%); Ácido elágico ramnosídeo (18%); Ácido elágico (17%); Monogaloil glicosídeo (4%); Hexahidroxidifenol glicosídeo (3.5%); Ácido elágico glicosídeo (3%); Metil quercetina di-glicosídeo (1%); Ácido cumaroil quínico (1%).
Tocoferóis	1,2 ± 0,1	α-tocoferol (100%)
Tocotrienóis	nd	-
Ácido ascórbico	nd	-

^aOs resultados correspondem a média (base seca) ± desvio padrão. ^bmg equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g. nd=não detectado

4.2 Composição fitoquímica do extrato etanólico da polpa do piquiá

O cromatograma do HPLC-DAD ilustra os carotenoides (Figura 13a) e compostos fenólicos (Figura 13b) detectados no extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá. O conteúdo desses compostos e as porcentagens de seus principais constituintes estão mostrados na Tabela 4. O extrato etanólico da polpa do piquiá revelou a presença de compostos fenólicos totais (3361,13 ± 131,85 µg/g de extrato) e carotenoides totais (22,36 ± 0,71 µg/g de extrato). Entre os carotenoides e os compostos fenólicos encontrados, luteína-like (carotenóide não identificado com as mesmas propriedades UV-vis da luteína), all-trans-neoxantina e ácido elágico foram os mais frequentes.

Figura 13: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá. (a) Carotenoides: 1: *all-trans*-neoxantina; 2: *9-cis*-neoxantina; 3: *all-trans*-violaxantina; 4: Luteína-*like*; 5: *9'-cis*-neoxantina; 6: *all-trans*-anteraxantina; 7: *9-cis*-Violaxantina; 8: *all-trans*-luteína; 9: *9-cis*-mutatoxantina; 10: *all-trans*-zeaxantina; 11: *9-cis*-anteraxantina; 12: *all-trans*- β -caroteno. (b) Compostos fenólicos: 1: monogaloil glicosídeo; 2: ácido gálico; 3: glicosídeo cumaroil-galoil; 4: ácido cumaroil quínico; 5: HHDP di-glicosídeo; 6: ácido elágico glicosídeo; 7: ácido elágico arabinosídeo; 8: ácido elágico ramnosídeo; 9: ácido elágico; 10: ácido elágico metil ramnosídeo; 11: di-glicosídeo metil quercetina; 12: ácido elágico di-metil arabinosídeo

Tabela 4: Compostos fitoquímicos do extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá

Carotenoides		Compostos fenólicos	
Compostos	Conteúdo ($\mu\text{g/g}$ extrato)*	Compostos	Conteúdo ($\mu\text{g/g}$ extrato)*
<i>all-trans</i> -Neoxantina ¹	$3,20 \pm 0,69$	Monogaloil glicosídeo ¹	$102,4 \pm 4,21$
<i>9-cis</i> -Neoxantina ¹	$0,89 \pm 0,40$	Ácido gálico ⁷	$292,19 \pm 9,58$
<i>all-trans</i> -Violaxantina ²	$1,65 \pm 0,27$	Glicosídeo cumaroil-galoil ⁸	$12,59 \pm 0,53$
Luteína- <i>like</i> ⁵	$5,24 \pm 0,11$	Ácido cumaroil quínico ⁸	$118,62 \pm 1,18$
<i>9'-cis</i> -Neoxantina ¹	$1,83 \pm 0,89$	HHDP diglicosídeo ⁷	$66,92 \pm 5,71$
<i>all-trans</i> -Anteraxantina ³	$2,00 \pm 0,52$	Ácido elágico glicosídeo ⁹	$146,90 \pm 8,68$
<i>9-cis</i> -Violaxantina ²	$0,84 \pm 0,22$	Ácido elágico arabinosídeo ⁹	$394,21 \pm 13,78$
<i>all-trans</i> -Luteína ⁵	$1,43 \pm 0,37$	Ácido elágico ramnosídeo ⁹	$263,69 \pm 10,26$
<i>9-cis</i> -Mutatoxantina ⁴	$1,12 \pm 0,41$	Ácido elágico ⁹	$1838,61 \pm 84,77$
<i>all-trans</i> -Zeaxantina ⁴	$2,81 \pm 0,25$	Ácido elágico metil ramnosídeo ⁹	$50,28 \pm 1,36$
<i>9-cis</i> -Anteraxantina ³	$1,33 \pm 0,28$	Di-glicosídeo metil quercetina ¹⁰	$22,26 \pm 0,96$
<i>all-trans</i> - β -Caroteno ⁶	< LOQ	Ácido elágico di-metil arabinosídeo ⁹	$52,82 \pm 2,33$
Total ($\mu\text{g/g}$ extrato)	$22,36 \pm 0,71$		$3361,13 \pm 131,85$

*n=3. LOQ: valor menor que o limite de quantificação. HHDP: hexahidroxidifenol. Os picos foram quantificados como equivalentes de *9-cis*-neoxantina¹, violaxantina², anteraxantina³, zeaxantina⁴, luteína⁵, β -caroteno⁶, ácido gálico⁷, ácido cumarico⁸, ácido elágico⁹ e metil quercetina¹⁰

Os resultados da análise fitoquímica mostraram diferenças entre a polpa liofilizada do piquiá e o seu extrato etanólico quanto a concentração e composição de carotenoides e compostos fenólicos totais. O extrato apresentou quantidades maiores de compostos fenólicos totais (aproximadamente 1,4 vezes mais concentrado) quando comparado com a polpa liofilizada, enquanto que a polpa apresentou concentrações maiores de carotenoides totais (aproximadamente 3 vezes mais carotenoides) comparada com o extrato. Além disso, a caracterização fitoquímica dos carotenoides e compostos fenólicos foi diferente entre o extrato e a polpa. Na polpa liofilizada, o carotenoide predominante foi anteraxantina e no seu extrato os carotenoides mais frequentes foram luteína-like e *all-trans*-neoxantina. O ácido gálico foi o composto fenólico predominante na polpa do piquiá, enquanto que no seu extrato o fenol mais abundante foi o ácido elágico.

4.3 Variação do peso corpóreo e relação entre peso dos órgãos e peso corpóreo

Os primeiros parâmetros avaliados neste estudo foram a evolução do peso corpóreo, ganho de peso total, e as relações peso do rim/peso corpóreo, peso do fígado/peso corpóreo e peso do coração/peso corpóreo. O peso corpóreo foi monitorado diariamente durante todo o experimento. Os pesos dos órgãos foram expressos como valores relativos (expressos como a porcentagem em relação ao peso corpóreo). Na tabela 5, estão apresentados os dados obtidos dos grupos tratados com a polpa do piquiá, enquanto que na tabela 6 estão mostrados os dados dos grupos tratados com o extrato da polpa do piquiá e seus respectivos controles. De acordo com os resultados obtidos, os animais de todos os grupos experimentais ganharam peso durante todo o tratamento. Entretanto, o grupo Piquiá 300 + DXR apresentou menor ganho de peso corpóreo quando comparado com o grupo óleo + DXR (Tabela 5). Os animais que receberam o extrato etanólico da polpa do piquiá apresentaram um ganho de peso corpóreo menor do que aqueles dos grupos controle água e DXR (Tabela 6).

Em experimentos de avaliação toxicológica, a comparação entre o peso dos órgãos nos grupos tratados e não tratados é usada para prever efeitos tóxicos do composto teste e para identificar possíveis órgãos-alvo mais afetados pela exposição (WOLFSEGGER et al., 2009). Hipertrofias hepática e cardíaca estão frequentemente

associadas com o aumento dos pesos do fígado e coração, respectivamente. Enquanto que mudanças no peso dos rins podem ser resultantes de hiperplasia (SELLERS et al., 2007). Os resultados do presente trabalho mostraram que as relações do peso do rim/peso corpóreo, peso do fígado/peso corpóreo e peso do coração/peso corpóreo não apresentaram diferenças significativas entre todos os grupos de tratamento, indicando que o tratamento com a polpa do piquiá ou com o seu extrato etanólico não apresentaram resultados quanto à possíveis alterações hipertróficas no rim, fígado e coração (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5: Média $\pm$ desvio padrão da variação do peso corpóreo (diferença entre o peso corpóreo no último dia de tratamento e o peso no primeiro dia) e relações do peso dos órgãos/peso corpóreo de ratos Wistar tratados com diferentes doses da polpa do piquiá, associada ou não a doxorubicina (15 mg/kg p.c., i.p.)

Grupo	Ganho de peso corpóreo (g)	Peso relativo do fígado (%)	Peso relativo dos rins (%)	Peso relativo do coração (%)
Óleo mineral	161,3 $\pm$ 16,4	4,54 $\pm$ 0,51	0,99 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,03
Piquiá 75mg/kg	135,4 $\pm$ 10,0	4,53 $\pm$ 0,12	0,91 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,04
Piquiá 150 mg/kg	144,5 $\pm$ 20,6	4,70 $\pm$ 0,51	0,88 $\pm$ 0,08	0,38 $\pm$ 0,07
Piquiá 300 mg/kg	135,9 $\pm$ 7,8	4,75 $\pm$ 0,27	0,92 $\pm$ 0,08	0,44 $\pm$ 0,07
Óleo + DXR	153,8 $\pm$ 14,6	5,03 $\pm$ 0,30	0,99 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,06
Piquiá 75 + DXR	147,4 $\pm$ 16,0	4,91 $\pm$ 0,31	0,96 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,03
Piquiá 150 + DXR	138,7 $\pm$ 24,6	4,66 $\pm$ 0,27	0,93 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,05
Piquiá 300 + DXR	114,5 $\pm$ 17,7 ^a	4,66 $\pm$ 0,26	0,96 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,02

^aEstatisticamente diferente do grupo Óleo + DXR ($p < 0,05$). One way ANOVA e teste de Dunnet

Tabela 6: Média $\pm$ desvio padrão da variação do peso corpóreo (diferença entre o peso corpóreo no último dia de tratamento e o peso no primeiro dia) e relações do peso dos órgãos/peso corpóreo de ratos Wistar tratados com o extrato da polpa do piquiá (75 mg/kg p.c.), associado ou não a doxorubicina (15 mg/kg p.c., i.p.)

Grupo	Ganho de peso corpóreo (g)	Peso relativo do fígado (%)	Peso relativo dos rins (%)	Peso relativo do coração (%)
Controle água	159,6 $\pm$ 13,5	4,73 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,04
Extrato piquiá 75 mg/kg	114,5 $\pm$ 32,2 ^a	4,58 $\pm$ 0,74	0,94 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,04
DXR	151,7 $\pm$ 30,9	4,73 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,03
Extrato piquiá 75+ DXR	109,6 $\pm$ 21,1 ^b	5,08 $\pm$ 0,58	1,01 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,03

^aEstatisticamente diferente do grupo controle água; ^bEstatisticamente diferente do grupo DXR ($p < 0,05$). One way ANOVA e teste de Dunnet

4.4 Ensaio do cometa em fígado, rim e coração

4.4.1 Avaliação da genotoxicidade e da antigenotoxicidade da polpa liofilizada do piquiá

Testes *in vivo* em genética toxicológica têm sido tradicionalmente utilizados para a maioria das classes de produtos, incluindo produtos farmacêuticos, industriais, químicos, agroquímicos e produtos de consumo e são importantes na avaliação dos riscos de genotoxicidade e mutagenicidade. Em comparação com ensaios *in vitro*, ensaios utilizando modelos *in vivo* são mais completos, uma vez que possibilitam a avaliação dos efeitos de substâncias que podem ser metabolizadas e se tornarem mais tóxicas que a substância primária, além de permitirem o estudo de diferentes vias e durações de tratamentos (KRISHNA; HAYASHI, 2000; ROTHFUSS et al., 2011). A eletroforese alcalina de célula única em gel, mais conhecido como ensaio do cometa, tem sido bastante utilizada para avaliar a genotoxicidade de diferentes classes de produtos e seu uso em estudos de dose repetida é cientificamente aceito (ROTHFUSS et al., 2011).

A escolha da via de administração das substâncias tem grande importância nos estudos, e segundo Hartmann et al. (2003), a administração do controle positivo não precisa ser, necessariamente, a mesma via do composto a ser avaliado. Neste caso, este estudo aproximou as vias de administração como normalmente os compostos são recebidos (quimioterápico por via intravenosa e o consumo da fruta por via oral).

A seleção das doses a serem utilizadas também é um aspecto importante nos estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade. Devido à ausência de dados na literatura que demonstrem os efeitos tóxicos, citotóxicos ou biológicos da polpa ou do extrato do piquiá *in vivo* ou *in vitro*, e ausência de estudos sobre a quantidade média consumida desse fruto pelos habitantes da região Amazônica, as doses da polpa do piquiá e do seu extrato etanólico foram escolhidas de acordo com doses de extratos de outras frutas utilizadas em outros estudos de genotoxicidade e mutagenicidade. No trabalho de Grover et al. (2009), foram realizados os testes do cometa, MN e aberrações cromossômicas após o tratamento, por gavagem, de ratos com extratos metanólicos das sementes da fruta pinha (*Annona squamosa*) em três diferentes doses (75, 150 e 300 mg/kg p.c.). Vieira, Santos e Chen-Chen (2010) trataram camundongos, por gavagem, com extrato etanólico da polpa da jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) nas

doses de 100, 200 e 300 mg/kg p.c. e avaliaram a mutagenicidade e citotoxicidade dessa fruta usando o teste do MN em medula óssea. Sánchez-Lamar et al. (2008) estudaram os efeitos genotóxicos, por meio do teste do MN em medula óssea, do extrato etanólico da polpa do romã (*Punica granatum*) nas doses de 7, 70, 184, 369 e 700 mg/kg p.c., administradas por injeção intraperitoneal.

Os critérios para a escolha das doses nos estudos de genotoxicidade com dose repetida são: dose máxima viável (solubilidade), baseada nas propriedades físico-químicas do composto; o platô de exposição plasmática ou a acumulação plasmática do composto; e a dose limite de 1000 mg/kg/dia (para tratamentos de 14 dias ou mais) (ROTHFUSS et al., 2011). No presente estudo, não foi possível testar doses acima de 300 mg/kg/dia, devido a solubilidade da polpa liofilizada.

A DXR é um agente genotóxico efetivo tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e a administração de uma única dose em roedores mostrou-se capaz de induzir genotoxicidade em tecidos como fígado, rins e medula óssea e também foi efetiva na indução de cardiotoxicidade (AISSA et al., 2012; BOKULIC et al., 2011; RAMOS et al., 2011; RASHIKH et al., 2011; RIBEIRO et al., 2010; TAKEUCHI; ANTUNES; TAKAHASHI, 2008; YALCIN et al., 2010; ZORDOKY et al., 2010). Estudos demonstraram a indução de genotoxicidade 24 h após uma única injeção de DXR em roedores (AISSA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2010). Dessa forma, a DXR foi o fármaco escolhido como controle positivo neste trabalho.

Para a realização do ensaio do cometa, é necessário a prévia avaliação da viabilidade celular. No presente trabalho, foi utilizado o método de exclusão por azul de Tripan e as viabilidades celulares mostraram-se superiores a 75% para todos os tratamentos. Além disso, os resultados não mostraram diferença estatística na viabilidade celular no fígado, rim e coração entre todos os grupos de tratamento, indicando ausência de citotoxicidade da polpa e da DXR nas doses estudadas.

Os resultados obtidos no ensaio do cometa em células hepáticas, renais e cardíacas mostraram que o tratamento com a polpa do piquiá, nas três diferentes doses, não alterou estatisticamente a %DNA na cauda quando comparado com o grupo óleo mineral, demonstrando ausência de genotoxicidade da polpa. O grupo óleo + DXR apresentou aumento significativo de danos ao DNA, em todos os órgãos avaliados, quando comparado com o grupo óleo mineral, o que confirma a ação genotóxica desse antitumoral, validando os ensaios (Figura 14).

Figura 14: %DNA na cauda em células do fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com a polpa liofilizada do piquiá em diferentes doses (75, 150 e 300 mg/kg p.c.) e sua associação com doxorubicina (15 mg/kg p.c., i.p.). 100 nucleoides foram analisados por animal, seis animais por grupo. ^aSignificativamente diferente do grupo óleo mineral ($p < 0,05$). ^bSignificativamente diferente do grupo óleo + DXR ($p < 0,05$). One way ANOVA e teste de Dunnett

No presente trabalho, a taxa basal de danos ao DNA nas células do fígado, rim e coração e também o efeito genotóxico da DXR foram similares nos três órgãos. A média da %DNA na cauda do grupo óleo mineral foi de $8,4 \pm 3,6$; $6,5 \pm 1,6$ e $8,7 \pm 2,6$ nas células hepáticas, renais e cardíacas, respectivamente. Nos grupos óleo + DXR, a média da %DNA na cauda foi de $19,0 \pm 7,6$; $21,0 \pm 4,4$ e $20,6 \pm 5,2$ nas células hepáticas, renais e cardíacas, respectivamente. Outros trabalhos também relataram resultados semelhantes dos danos basais e das respostas genotóxicas no fígado, rim e coração de roedores. Hashimoto et al. (2008) encontraram taxas basais de migração do DNA (μm) de 6,39 e 6,12 em células de fígado e rim de ratos, respectivamente. O trabalho de Kadirvel et al. (2007) também apresentou semelhanças entre as taxas basais de danos ao DNA, detectados pelo cometa nas células renais e hepáticas de ratos Wistar. Kahan et al., (2010) aplicando o ensaio do cometa em células de fígado, rim e coração de camundongos também encontraram semelhanças entre esses três órgãos nos valores basais de danos no DNA (expressos pelo Tail Moment) e no efeito genotóxico induzido pelo peróxido de hidrogênio.

O tratamento com a polpa do piquiá foi capaz de reduzir significativamente a %DNA na cauda das células hepáticas, renais e cardíacas, quando comparado com o grupo óleo + DXR, demonstrando os efeitos antigenotóxicos da polpa do piquiá sobre os danos induzidos pela DXR. Entretanto, esse efeito antigenotóxico foi tecido

específico e também dose dependente, uma vez que no fígado e rim essa redução foi significativa nas menores doses, e no coração apenas a maior dose (300 mg/kg p.c) apresentou redução estatística da %DNA na cauda (Figura 14). No fígado o grupo Piquiá 75 + DXR apresentou redução nos danos em 81,1%. No rim os grupos Piquiá 75 + DXR e Piquiá 150 + DXR apresentaram redução nos danos em 56,5% e 55,8% respectivamente. No coração o tratamento com 300 mg/kg p.c. da polpa do piquiá reduziu em 68,9% os danos ao DNA induzidos pela DXR.

Os efeitos antigenotóxicos de outros frutos já foram relatados na literatura. Ribeiro et al. (2010), demonstraram o efeito protetor da polpa do açaí (*Euterpe oleracea Mart*) sobre os danos ao DNA induzidos pela DXR em camundongos Swiss usando o teste do MN e o ensaio do cometa. O extrato do fruto da acerola (*Malpighia glabra L.*) também apresentou antigenotoxicidade pelo teste do cometa em sangue periférico de camundongos (NUNES et al., 2011). Tratamentos agudo (48 horas), subagudo (28 dias) e crônico (56 dias) com o suco da polpa do fruto camu-camu (*Myrciaria dubia*) diminuiu os danos ao DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio em células de sangue periférico de camundongos avaliado pelo ensaio do cometa (DA SILVA et al., 2012). Além dos efeitos antigenotóxicos de frutos, os efeitos protetores sobre o DNA dos compostos fitoquímicos isolados encontrados na polpa do piquiá também já foram descritos na literatura (ABDELWAHED et al., 2007; FESTA et al., 2001; GANDHI; NAIR, 2005; GRADECKA-MEESTERS et al., 2011).

Entre os compostos fenólicos encontrados na polpa liofilizada do piquiá, o ácido gálico e o ácido elágico foram os mais abundantes. No trabalho de Abdelwahed et al (2007), utilizando o ensaio do cometa, o ácido gálico reduziu os danos ao DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio em linhagem celular de leucemia mielóide crônica (células K562). Nesse mesmo trabalho, o ácido gálico também demonstrou atividade antimutagênica, uma vez que reduziu a mutagenicidade induzida pela nifuroxazida e pela aflotaxina B1 pelo teste de *Escherichia coli* (SOS teste). O ácido gálico também demonstrou efeito antigenotóxico avaliado pelo ensaio do cometa, em sangue periférico, tanto *in vivo* (células de camundongos) quanto *in vitro* (células de sangue humano), sobre os danos induzidos pela radiação gama (GANDHI; NAIR, 2005). A linhagem celular de monócitos humanos (THP-1) submetida ao tratamento com alta concentração de glicose, apresentou aumento significativo da % de DNA na cauda medido pelo

ensaio do cometa, e esse tratamento quando associado ao ácido gálico apresentou diminuição dos danos ao DNA, demonstrando o efeito protetor desse composto fenólico sobre o DNA (KUPPAN et al., 2010).

Os efeitos antigenotóxicos do ácido elágico também já foram reportados. Em cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO), o ácido elágico demonstrou efeito protetor contra os danos ao DNA induzidos pela bleomicina e pelo peróxido de hidrogênio, avaliados pelo ensaio do cometa (FESTA et al., 2001). Em queratinócitos humanos (HaCaT), o ácido elágico apresentou efeito antigenotóxico contra os danos induzidos pelos raios UVA (HSEU et al., 2012). O efeito protetor *in vivo* do ácido elágico também foi investigado. Gradecka-Meesters et al. (2011), por meio do ensaio do cometa e do ³²P-*postlabelling assay* para adutos de DNA, demonstraram que o tratamento com ácido elágico foi capaz de reduzir os danos ao DNA induzidos pelo benzo[a]pireno em células de camundongo C57BL/6J.

Zeaxantina e α -tocoferol, os principais carotenoide e tocoferol encontrados na polpa do piquiá, respectivamente, também já demonstraram efeito antigenotóxico. Células epiteliais humanas (HLEC) tratadas com zeaxantina ou α -tocoferol apresentaram diminuição dos danos ao DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio avaliado pelo ensaio do cometa (GAO et al., 2011). A luteína, embora em menor proporção entre os carotenoides presentes na polpa do piquiá, também já foi investigada quanto seu potencial antigenotóxico. Serpeloni et al. (2010) demonstraram o efeito protetor da luteína contra os danos ao DNA induzidos pela cisplatina em células de camundongos Swiss, avaliado pelos testes do cometa e do MN.

4.4.2 Avaliação da genotoxicidade do extrato etanólico da polpa do piquiá

Os resultados do teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán não demonstraram diferença significativa na viabilidade das células do fígado, rim e coração nos grupos tratados com o extrato etanólico da polpa do piquiá quando comparado com o grupo controle água, indicando ausência de citotoxicidade do extrato nas condições estudadas. Os grupos DXR e extrato piquiá + DXR também não apresentaram diferença significativa na viabilidade celular do fígado, rim e coração quando comparado com o grupo controle água.

Ao contrário do que foi observado para a polpa do piquiá, o tratamento com o seu extrato etanólico, na dose de 75 mg/kg p.c., aumentou significativamente a %DNA na cauda em todos os órgãos avaliados quando comparado com o grupo controle água, indicando genotoxicidade. Para verificar se o extrato aumenta os efeitos genotóxicos da DXR, também foi realizado o tratamento simultâneo de DXR + extrato piquiá, e esse efeito foi observado apenas no rim (Figura 15).

Figura 15: %DNA na cauda em células do fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com o extrato etanólico da polpa do piquiá (75 mg/kg p.c.) e sua associação com doxorubicina (15 mg/kg p.c., i.p.). 100 nucleoides foram analisados por animal, seis animais por grupo. ^aSignificativamente diferente do grupo controle água ($p < 0,05$); ^bSignificativamente diferente do grupo DXR ($p < 0,05$). One way ANOVA e teste de Dunnet

Estudos mostrando efeitos genotóxicos de extratos de frutos já foram relatados na literatura. Grover et al. (2009) demonstraram que ratos Wistar tratados com 150 ou 300 mg/kg p.c. de extrato da semente da fruta pinha (*Annona squamosa*) apresentaram aumento significativo na migração do DNA. Sanchez-Lamar et al. (2008) encontraram que o extrato da polpa do romã (*Punica granatum*) possui efeitos genotóxicos quando testado *in vitro* e *in vivo*.

O resultado da análise dos compostos fitoquímicos do extrato etanólico da polpa do piquiá revelou a presença de maiores quantidades de compostos fenólicos totais (1,4x) e menores quantidades de carotenoides (3x), quando comparado com a polpa liofilizada. Além disso, a caracterização fitoquímica dos carotenoides e compostos fenólicos foi diferente entre o extrato e a polpa. Na polpa liofilizada do piquiá, o carotenoide predominante foi anteraxantina e no seu extrato etanólico os carotenoides mais

frequentes foram luteína-like e *all-trans*-neoxantina. O ácido gálico foi o composto fenólico predominante na polpa liofilizada do piquiá, enquanto que no seu extrato etanólico o fenol mais abundante foi o ácido elágico (Tabelas 3 e 4), sendo que esse último apresentou menor eficiência na eliminação de ROS e RNS comparado com o ácido gálico (CHISTE et al., 2012). Considerando a quantidade de compostos fenólicos totais e de carotenoides totais, a dose de 75 mg/kg p.c. do extrato é equivalente à dose de 106 mg/kg p.c. e 24 mg/kg p.c. de polpa liofilizada, respectivamente. Essa variação da composição fitoquímica entre a polpa liofilizada e seu extrato etanólico pode ser a responsável pela diferença dos seus efeitos no DNA.

Compostos fenólicos já foram descritos por apresentarem atividades antigenotóxicas e antimutagênicas por causa de suas atividades antioxidantes (GANDHI; NAIR, 2005; GAO et al., 2011; HSEU et al., 2012; KADIRVEL et al., 2007), entretanto, esses compostos também podem agir como pró-oxidantes e, dessa forma, podem induzir danos ao DNA (DAI; MUMPER, 2010). Por exemplo, apesar dos efeitos antigenotóxicos do ácido gálico (ABDELWAHED et al., 2007; GANDHI; NAIR, 2005; KUPPAN et al., 2010) e do ácido elágico (FESTA et al., 2001; GRADECKA-MEESTERS et al., 2011; HSEU et al., 2012) já terem sido investigados, seus efeitos genotóxicos também já foram demonstrados. No trabalho de Labieniec, Gabryelak e Falcioni (2003), tratamentos com diferentes concentrações de ácido gálico ou ácido elágico (5 a 240 μ M) induziram danos ao DNA avaliado pelo ensaio do cometa em cultura de células de glândulas digestivas de mexilhão (*Unio tumidus*). Também utilizando o ensaio do cometa, os ácidos elágico e gálico apresentaram efeitos genotóxicos em células de hamster (linhagem celular B14), e esse efeito não foi dose resposta, uma vez que a concentração de 60 μ M de ambos os compostos induziu o máximo nível de danos, enquanto que concentrações de 15, 30, 120, 180 e 240 μ M induziram menores níveis de lesões ao DNA (LABIENIEC; GABRYELAK, 2003). Células humanas de câncer de próstata (células PC-3) tratadas com ácido gálico em diferentes concentrações (50, 100 e 200 μ M) e em diferentes períodos de tempo (12, 24 e 48 horas) apresentaram aumento na migração do DNA no ensaio do cometa, confirmando que, em determinadas condições, esse composto apresenta efeito genotóxico (LIU et al., 2011).

Ainda não se sabe ao certo por quais mecanismos o ácido gálico exerce efeito genotóxico, mas tem se relacionado esse efeito com sua ação oxidante. Em células

humanas de fibroblasto pulmonar (HPF) o tratamento com ácido gálico induziu morte celular, aumentou os níveis de ROS e diminuiu GSH (YOU; PARK, 2011). Efeito semelhante foi observado em células de câncer de próstata (DU145), que após tratamento com ácido gálico, apresentaram aumento da geração de ROS e indução de apoptose (CHEN et al., 2009). Outro mecanismo, além dos efeitos oxidantes, também foi relacionado com a genotoxicidade do ácido gálico. Liu et al (2011) demonstraram que a genotoxicidade induzida pelo ácido gálico foi relacionada com a inibição da expressão de mRNA de genes de reparo do DNA.

Além dos efeitos opostos observados para o tratamento com a polpa e com o seu extrato, também foi encontrado que esses efeitos foram diferentes entre os tecidos avaliados. O efeito antigenotóxico da polpa no fígado e rim foi observado nas menores doses, e no coração na maior dose (Figura 14), enquanto que a genotoxicidade do extrato apresentou maiores valores no rim (Figura 15). Da Costa Lopes et al. (2000), usando o ensaio do cometa, observaram que o tratamento com extrato aquoso das folhas de *Echinodorus macrophyllus* (chapéu de couro), também rico em polifenóis, foi genotóxico no rim de camundongos, mas não apresentou esse efeito no fígado e sangue periférico. Esses resultados sugerem que os polifenóis podem exercer efeitos de modo tecido específico.

4.5 Teste do micronúcleo

4.5.1 Avaliação dos efeitos citotóxicos do tratamento com a polpa liofilizada do piquiá nas células da medula óssea

A progressão de eritrócitos policromáticos (PCE) para eritrócitos normocromáticos (NCE) na medula óssea é um importante indicador de citotoxicidade que pode ser avaliado em conjunto com o teste do MN (VENKATESH et al., 2007). A relação PCE/NCE é um indicador de aceleração ou inibição da eritropoiese. Um declínio nessa relação fornece evidências da citotoxicidade da substância teste (AL-HARBI, 1993). Os resultados do presente trabalho mostraram que os tratamentos com a polpa do piquiá nas três diferentes doses, bem como suas associações com a DXR, não alteraram estatisticamente a relação PCE/NCE, indicando ausência de efeitos citotóxicos da polpa do piquiá sobre a medula óssea (Figura 16).

Figura 16: Relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE) (PCE/NCE) na medula óssea de ratos Wistar tratados com a polpa do piquiá em diferentes doses (75, 150 ou 300 mg/kg, p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (15 mg/kg p.c., i.p.). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos. One way ANOVA e teste de Dunnet ($p > 0,05$)

4.5.2 Avaliação dos efeitos citotóxicos do tratamento com o extrato etanólico da polpa do piquiá nas células da medula óssea

Os animais tratados com o extrato etanólico da polpa do piquiá não apresentaram diferença significativa na relação PCE/NCE quando comparados com o grupo controle água, demonstrando ausência de efeitos citotóxicos do extrato sobre a medula óssea nas condições empregadas nesse estudo (Figura 17).

Figura 17: Relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE) (PCE/NCE) na medula óssea de ratos Wistar tratados com o extrato da polpa do piquiá (75 mg/kg p.c.) associado ou não ao antitumoral doxorrubicina (15 mg/kg p.c., i.p.). Não houve diferença estatística entre os grupos. One way ANOVA e teste de Dunnet ($p > 0,05$)

4.5.3 Avaliação da mutagenicidade e da antimutagenicidade da polpa liofilizada do piquiá

Nos testes do MN em medula óssea e sangue periférico, a frequência de PCE micronucleados (MN PCE) foi estatisticamente maior no grupo que recebeu DXR (óleo + DXR) em relação ao grupo controle (óleo mineral). O tratamento com a polpa do piquiá, nas três diferentes doses (75, 150 ou 300 mg/kg, p.c.), não alterou significativamente a frequência de células micronucleadas tanto na medula óssea, quanto no sangue periférico comparado ao grupo óleo mineral, indicando ausência de efeitos mutagênicos da polpa do piquiá nas doses testadas (Figura 18).

Figura 18: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE) na medula óssea e sangue periférico de ratos Wistar tratados com a polpa do piquiá em três diferentes doses (75, 150 ou 300 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (15 mg/kg p.c., i.p.). 2000 eritrócitos policromáticos (PCE) foram analisados na medula óssea para cada animal; 1000 PCE foram analisados no sangue periférico para cada animal; seis animais por grupo. ^aEstatisticamente diferente do grupo óleo mineral; ^bEstatisticamente diferente do grupo óleo + DXR. One way ANOVA e teste de Dunnet ($p < 0,05$)

Na medula óssea, os grupos piquiá (75, 150 e 300 mg/kg p.c.) + DXR apresentaram redução significativa da frequência de MN PCE em 50,0%, 38,5% e 39,3%, respectivamente, comparado com o grupo óleo + DXR, demonstrando a ação antimutagênica da polpa liofilizada (Figura 18). Os efeitos antimutagênicos de frutos tem sido demonstrados na literatura. Extratos da polpa da manga (PRASAD et al., 2008), das sementes de uva (YALCIN et al., 2010) e de jambolão (*Syzygium cumini*) (ARUN et al., 2011) demonstraram efeitos protetores sobre o DNA em

células da medula óssea de camundongos avaliados pelos testes do MN e aberrações cromossômicas.

Os compostos fenólicos e os carotenoides presentes na polpa do piquiá podem ser os responsáveis pelos seus efeitos protetores, uma vez que esses compostos isolados já foram demonstrados quanto suas ações antimutagênicas. Raushcer, Ehenharder e Platt (1998) avaliaram os efeitos antimutagênicos, usando os testes de Ames e do MN em medula óssea de camundongos, de vários carotenoides e de diversos extratos de frutas ricas em carotenoides. Seus resultados mostraram que os carotenoides (retinol, β -caroteno, α -caroteno, luteína) e os extratos da laranja, do tomate e da cenoura, apresentaram alta atividade antimutagênica. Aissa et al (2012) demonstraram o efeito protetor do β -caroteno sobre os danos ao DNA induzidos pela DXR em células da medula óssea, rim e fígado de ratos Wistar. A co-administração de ácido ascórbico e α -tocoferol reduziu significativamente os danos ao DNA, quantificados pelo ensaio do cometa, induzidos pelo arsênio em células renais, hepáticas e sangue periférico de ratos Wistar (KADIRVEL et al., 2007).

Os resultados do ensaio do cometa e do MN demonstraram que as menores doses da polpa liofilizada do piquiá apresentaram os maiores efeitos protetores, indicando assim, um efeito dose-resposta inverso. Avaliações da relação dose-resposta são complexas pelo fato de que muitos compostos quimioprotetores atuam simultaneamente em diferentes níveis de proteção (KNASMULLER et al., 2002), e também é importante ressaltar que as funções dos compostos fenólicos são dependentes de alguns fatores e sob certas condições podem atuar como pró-oxidantes (DAI; MUMPER, 2010). Além disso, as condições biológicas *in vivo* podem divergir entre os diferentes tecidos e órgãos. Dessa maneira, a ausência da relação dose-resposta pode ser atribuída à ativação de diferentes mecanismos dependendo da dose do piquiá utilizada e do tecido avaliado.

Outros estudos também encontraram um efeito antimutagênico dose-resposta inverso. Antunes e Takahashi (1998) demonstraram que as menores doses (200 mg/kg p.c.) das vitaminas C ou E, ou suas associações, foram capazes de reduzir os danos cromossômicos induzidos pela DXR em células da medula óssea de ratos Wistar, por outro lado, as maiores doses testadas dessas vitaminas (800 mg/kg p.c.) apresentaram menor efeito antimutagênico. Ananthi, Chandra e Santhiya (2010) trataram camundongos com extrato aquoso de *Hemidesmus indicus* e verificaram

que a menor dose (50 mg/kg p.c.) reduziu em 74,1% a frequência de MNPCE na medula óssea induzida pela cisplatina, enquanto que a maior dose desse extrato (200 mg/kg p.c.) reduziu em 51,7% a frequência de MNPCE. Fibroblastos de hamster chinês (V79) tratados com diferentes concentrações do extrato etanólico do fruto guarambá, ou lobeira (*Solanum lycocarpum*), apresentaram as seguintes reduções das aberrações cromossômicas induzidas pela DXR: 57,89% (tratamento com 16 µg/mL de extrato); 47,37% (32 µg/mL) e 36,84% (64 µg/mL) (TAVARES et al., 2011). Extratos das folhas da *Copaifera langsdorffii* apresentaram efeito antimutagênico pelo ensaio do MN em sangue periférico de camundongos, sendo que a menor dose testada (10 mg/kg p.c.) reduziu os danos induzidos pela DXR em 76,92%, e a maior dose (80 mg/kg p.c.) reduziu os danos em 59,34% (ALVES et al., 2012).

Os principais mecanismos antimutagênicos são: (1) inativação química ou enzimática do mutágeno, que acontece principalmente através da indução das enzimas do citocromo P-450 e indução de enzimas de metabolização de fase II, como a glutatona transferase; (2) remoção do mutágeno, em que alguns desmutágenos são capazes de se ligarem aos mutágenos e dessa forma esses últimos não se ligam ao DNA; (3) inibição da formação de espécies reativas e (4) remoção das espécies reativas. Os efeitos antimutagênicos dos compostos fenólicos e carotenoides estão principalmente relacionados com suas ações antioxidantes, o que diminui as concentrações de espécies reativas e, conseqüentemente, reduz os danos ao DNA, proteínas e a outras estruturas celulares (BHATTACHARYA, 2011).

4.5.4 Avaliação da mutagenicidade e da antimutagenicidade do extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá

O tratamento com o extrato etanólico da polpa do piquiá não aumentou a frequência de MN PCE na medula óssea nem no sangue periférico, indicando que o extrato, nas condições empregadas nesse estudo, não possui efeito mutagênico. Os grupos extrato piquiá + DXR não apresentaram redução na frequência de MN PCE quando comparados com os grupos DXR, tanto na medula óssea quanto no sangue periférico, indicando que o tratamento com 75 mg/kg p.c de extrato não foi capaz de reduzir os danos ao DNA induzidos pela DXR (Figura 19).

Figura 19: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE) na medula óssea e sangue periférico de ratos Wistar tratados com o extrato da polpa do piquiá (75 mg/kg p.c), associado ou não ao antitumoral doxorubicina (15 mg/kg p.c., i.p.). 2000 eritrócitos policromáticos (PCE) foram analisados na medula óssea para cada animal; 1000 PCE foram analisados no sangue periférico para cada animal; seis animais por grupo. ^aEstatisticamente diferente do grupo controle água. One way ANOVA e teste de Dunnet ($p < 0,05$)

Os resultados desse trabalho mostraram que o extrato do piquiá apresentou efeito genotóxico em células do fígado, rim e coração, quando avaliado pelo ensaio do cometa (Figura 15), mas não mostrou efeito mutagênico em células da medula óssea e sangue periférico, quando avaliado pelo teste do MN (Figura 19). Enquanto o ensaio do cometa detecta lesões ainda passíveis de reparo, o teste do MN detecta mutações, alterações definitivas no DNA, resultantes de lesões não reparadas (ROTHFUSS et al., 2011).

4.6 Avaliação bioquímica de TBARS e GSH

4.6.1 Avaliação bioquímica de TBARS e GSH em ratos tratados com a polpa liofilizada do piquiá

As figuras 20 e 21 mostram os resultados das dosagens de TBARS e GSH, respectivamente, nos tecidos hepático, renal e cardíaco de ratos tratados com a polpa liofilizada do piquiá. O grupo óleo + DXR apresentou aumento significativo de TBARS no fígado e coração, entretanto, não apresentou diferença nos níveis de GSH nos três tecidos avaliados quando comparado com o grupo óleo mineral. No rim, também não houve aumento de TBARS no grupo óleo + DXR.

Muitos estudos com o objetivo de induzir cardiotoxicidade e estresse oxidativo, demonstraram que uma única aplicação de DXR causa aumento de TBARS e diminuição de GSH em diversos tecidos de camundongos e ratos, entretanto, nesses trabalhos, o tempo mínimo de exposição a esse fármaco foi de 48 horas (ALPSOY et al., 2011; HAMLAOUI et al., 2012; TORRES et al., 2010; VAPA et al., 2012), ao contrário do presente estudo onde o tempo foi de 24 horas. Nossos resultados estão de acordo com Boutabet et al. (2011), que demonstraram que a administração de 10 mg/kg p.c. de DXR em ratos Wistar não alterou a concentração de GSH nos rins após 24 horas de exposição, sendo que a concentração de GSH foi diminuída somente após 7 dias de exposição à DXR.

De acordo com os protocolos para os testes de genotoxicidade em estudo de dose repetida, as amostras de medula óssea para o teste do MN devem ser coletadas no prazo máximo de 24 horas após o último tratamento, enquanto que as células do sangue periférico devem ser coletadas no prazo máximo de 40 horas após o último tratamento, sendo que o prazo de 24 horas é o mais recomendado (HAYASHI et al., 2000). Em relação ao ensaio do cometa, o protocolo estabelecido por Tice *et al.* (2000) sugere a utilização de dois tempos amostrais, de 3 a 6 horas ou 22 a 26 horas, após a última administração da substância teste. Por essas razões, no presente trabalho, que tem como objetivo as avaliações de genotoxicidade, foi adotado o tempo de exposição à DXR de 24 horas.

Figura 20: Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com a polpa liofilizada do piquiá (75, 150 ou 300 mg/kg p.c.). ^aSignificativamente diferente do grupo óleo mineral ($p < 0,05$); ^bSignificativamente diferente do grupo óleo + DXR ($p < 0,05$). One way ANOVA e teste de Dunnet ($n=6$ /grupo)

Figura 21: Determinação da glutathiona reduzida (GSH) em fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com a polpa liofilizada do piquiá (75, 150 ou 300 mg/kg p.c.). ^aSignificativamente diferente do grupo óleo mineral ($p < 0,05$); ^bSignificativamente diferente do grupo óleo + DXR ($p < 0,05$). One way ANOVA e teste de Dunnet ($n=6$ /grupo)

A DXR é um potente fármaco antitumoral considerado o mais tóxico entre as antraciclinas. O principal evento responsável por sua toxicidade é a indução de estresse oxidativo. O tecido cardíaco é o órgão-alvo da DXR e a peroxidação lipídica representa o principal mecanismo envolvido na sua cardiotoxicidade, uma vez que a DXR tem alta afinidade pelos componentes fosfolipídios das membranas dos cardiomiócitos, causando sua acumulação no tecido cardíaco (LEBRECHT et al., 2007; SIMUNEK et al., 2009; TRIVEDI et al., 2011). No presente estudo, a administração de DXR aumentou significativamente a concentração de TBARS no fígado e coração, sendo que no tecido cardíaco esse efeito foi maior. Mesmo no grupo óleo mineral, os níveis de TBARS cardíaco foram maiores que no fígado e rim. Comparado com outros tecidos e órgãos, o sistema antioxidante do coração é considerado moderado porque apresenta menores quantidades de enzimas antioxidantes (150 vezes menos catalase e 4 vezes menos superóxido dismutase comparado com o fígado, por exemplo) (KANG, 1999; TORRES et al., 2010). Esse fato explica os maiores níveis de peroxidação lipídica observados no coração.

Estudos experimentais utilizando a combinação de antioxidantes da dieta com DXR têm sido avaliados como terapia para inibir a geração de ROS e a cardiotoxicidade induzidas pela DXR. O tratamento com antioxidantes, tais como o fulerenol (TORRES et al., 2010), L-carnitina (ALSHABANAH et al., 2010), hesperetina (TRIVEDI et al., 2011), extratos de quebra-quebra (*Phyllanthus niruri*) (THIPPESWAMY et al., 2011), e extratos das sementes e da casca de uva (MOKNI et al., 2012) reduziram a cardiotoxicidade e a peroxidação lipídica induzidas pela DXR em tecido cardíaco de ratos.

Muitos polifenóis da dieta são conhecidos antioxidantes e estão associados com a redução do risco de desenvolvimento de diversos tipos de doenças, incluindo câncer e doenças cardiovasculares (HU, 2011). Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são os metabólitos secundários mais abundantes encontrados nas plantas (DAI; MUMPER, 2010), inclusive encontrados em maior proporção na polpa do piquiá (Figura 12 e tabela 3). Esses compostos podem exercer seus efeitos antioxidantes através de mecanismos diretos e/ou indiretos. O principal mecanismo direto envolve a remoção das espécies reativas (ROS e RNS), e os mecanismos indiretos são: (1) supressão da formação de espécies reativas pela inibição de enzimas ou como quelantes de metais envolvidos na produção de radicais livres; e (2) aumento das defesas antioxidantes (DAI; MUMPER, 2010; HU, 2011).

O mecanismo direto da remoção das espécies reativas pelos compostos fenólicos (POH) acontece principalmente pela doação de átomos de hidrogênio para os radicais (R), formando radicais fenoxi intermediários ($PO^{\bullet}$) que são relativamente estáveis e que também reagem e inativam outros radicais. O esquema dessas reações é: $R + POH = RH + PO^{\bullet}$ e $PO^{\bullet} + R = POR$. Os compostos fenólicos possuem estruturas químicas ideais para a remoção/inibição das espécies reativas por possuírem grupos hidroxilas que são propensos a doar átomos de hidrogênio ou elétrons para o radical livre, além de possuir sistema aromático conjugado que desloca elétrons desemparelhados (DAI; MUMPER, 2010).

Alguns compostos fenólicos podem conjugar metais de transição, prevenindo a formação de radicais livres induzidos por metais. Metais como Cu^{+} e Fe^{2+} interagem com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através da reação de Fenton, formando radicais hidroxilas ($\bullet OH$), que são os radicais mais reativos. Compostos fenólicos como catecol e éster de ácido gálico, se ligam ao Fe^{2+} ou formam complexos inativos com Cu^{+} ou Fe^{2+} , e assim, inibem a formação de radicais livres induzidos por metais. Esses dois mecanismos de ação (remoção das espécies reativas e conjugação com metais de transição), causam redução das concentrações de radicais livres e espécies oxidantes e conseqüentemente diminuem a oxidação de moléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (DAI; MUMPER, 2010).

Outro mecanismo antioxidante indireto dos compostos fenólicos é pela indução de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), glutathione S transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (HU, 2011). A GPx reduz peróxidos de

hidrogênio usando GSH como substrato (KARIHTALA; SOINI, 2007). Dessa forma, aumento de GSH é um indicativo indireto de efeito antioxidante. No presente trabalho, os grupos piquiá, nas três doses avaliadas, apresentaram aumento significativo da concentração de GSH no tecido hepático comparados com o grupo óleo mineral (Figura 21). No coração, o tratamento com a polpa do piquiá, nas três doses avaliadas, reduziu significativamente os níveis de TBARS induzidos pela DXR, sendo que a maior dose apresentou o maior efeito (Figura 20). Esses resultados sugerem que a polpa do piquiá possui efeito antioxidante tecido específico, e são, em parte, um dos mecanismos relacionados com os efeitos protetores observados no ensaio do cometa em células do coração, onde a maior dose da polpa do piquiá reduziu significativamente a genotoxicidade induzida pela DXR (Figura 14).

4.6.2 Avaliação bioquímica de TBARS e GSH em ratos tratados com o extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá

Nas figuras 22 e 23, estão apresentados os resultados obtidos das avaliações bioquímicas de TBARS e GSH, respectivamente, nos tecidos hepático, renal e cardíaco de ratos tratados com o extrato etanólico da polpa do piquiá. Os tratamentos com DXR ou com o extrato do piquiá não alteraram as concentrações de TBARS e GSH no fígado e rim. Entretanto, no tecido cardíaco o tratamento com DXR ou com o extrato aumentaram significativamente as concentrações de TBARS, enquanto que os níveis de GSH não foram alterados.

Figura 22: Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com o extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá (75 mg/kg p.c.). ^aSignificativamente diferente do grupo óleo mineral ($p < 0,05$); ^bSignificativamente diferente do grupo óleo + DXR ($p < 0,05$). One way ANOVA e teste de Dunnet ($n=6/\text{grupo}$)

Figura 23: Determinação da glutathiona reduzida (GSH) em fígado, rim e coração de ratos Wistar tratados com o extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá (75 mg/kg p.c.). Não houve diferença estatística. One way ANOVA e teste de Dunnet (n=6/grupo)

Assim como foi observado nos ensaios de genotoxicidade, os resultados das análises de TBARS também demonstraram efeitos opostos entre a polpa liofilizada do piquiá e seu extrato etanólico. A polpa do piquiá diminuiu os níveis de TBARS no coração induzidos pela DXR, enquanto que o seu extrato etanólico acentuou a peroxidação lipídica induzida pela DXR. Além disso, o extrato por si só aumentou os níveis de TBARS no coração comparado com o grupo controle água, o que pode ser relacionado com a genotoxicidade nas células cardíacas. No rim, também foram observados efeitos opostos, uma vez que a maior dose da polpa do piquiá aumentou TBARS comparado com o grupo óleo mineral (Figura 20), enquanto que o extrato não alterou esse parâmetro nos rins (Figura 22). A explicação para esses efeitos distintos pode estar na diferença da composição fitoquímica entre a polpa do piquiá e seu extrato. Da mesma forma que a polpa do piquiá apresentou efeitos dependendo do tecido avaliado, o seu extrato também demonstrou efeito tecido específico, sendo que o coração foi o órgão mais afetado, uma vez que seu sistema de defesas antioxidantes é moderado comparado com outros tecidos (KANG, 1999; TORRES et al., 2010).

Apesar dos efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos terem sido demonstrados, sob certas condições esses compostos podem atuar como pró-oxidantes causando peroxidação lipídica (DAI; MUMPER, 2010; INOUE et al., 2011). Em vez de terminar uma reação em cadeia de radicais livres através da reação com um segundo radical livre, o radical fenoxi intermediário ($PO^{\bullet}$) pode interagir com

oxigênio e produzir quinonas ($P=O$) e ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), como a reação a seguir: $PO^{\cdot} + O_2 = P=O + O_2^{\cdot-}$. Algumas condições como, por exemplo, alto pH, altas concentrações de íons de metais de transição e presença de moléculas de oxigênio, favorecem a autooxidação dos compostos fenólicos. Além disso, compostos fenólicos com baixo peso molecular, como quercetina e ácido gálico, são facilmente oxidados (DAI; MUMPER, 2010).

Chiste *et al.* (2012), usando ensaios *in vitro* de remoção de ROS e RNS (ensaios que não utilizam culturas celulares), demonstraram que os extratos da polpa do piquiá, incluindo o extrato etanólico, apresentaram alto potencial de remoção de ROS e RNS. Entretanto, as condições biológicas *in vivo* diferem drasticamente das condições *in vitro* e, por isso, nem sempre é possível extrapolar esses resultados para sistemas *in vivo* (DAI; MUMPER, 2010).

4.7 Expressão de mRNA dos genes *Ephx2* e *Tp53*

4.7.1 Expressão de mRNA dos genes *Ephx2* e *Tp53* em ratos tratados com a polpa do piquiá

Para a análise da expressão de mRNA, foram escolhidas as doses de 75 e 300 mg/kg p.c., uma vez que a menor dose da polpa do piquiá apresentou efeitos antigenotóxicos no fígado e rim, e também no teste do MN demonstrou maior redução da frequência de MN PCE, e no coração a maior dose apresentou efeitos protetores. As figuras 24 e 26 representam os gráficos da expressão relativa de mRNA dos genes *Ephx2* e *Tp53*, respectivamente.

Embora os mecanismos exatos pelos quais a DXR induz toxicidade ainda não estejam completamente esclarecidos, tem sido proposto que as toxicidades hepáticas e renais estão relacionadas com a indução de estresse oxidativo, enquanto que vários são os mecanismos cardiotoxícos, como a indução de estresse oxidativo, alteração do metabolismo energético, alterações de sinalização molecular e morte celular por apoptose (ZORDOKY et al., 2010; ZORDOKY et al., 2011). Alterações nas expressões de genes da família do citocromo P450 (CYP) e *Ephx2* também foram relatados como um dos mecanismos responsáveis pela toxicidade da DXR. Ratos Sprague-Dawley tratados por 24 horas com 15 mg/kg p.c. de DXR

apresentaram aumento da expressão de mRNA do gene *Ephx2* e de diversos genes *CYP*, aumento da expressão e da atividade da enzima epóxido hidrolase solúvel (sEH – *soluble epoxide hydrolase*), diminuição de ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) e aumento de ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs) no coração (ZORDOKY et al., 2010). No fígado e rim, esse mesmo tratamento não alterou a expressão de mRNA do gene *Ephx2*, entretanto, a expressão da proteína sEH foi diminuída e as concentrações de EETs foram aumentadas apenas no rim (ZORDOKY et al., 2011). Esses resultados demonstram que a toxicidade aguda da DXR altera a expressão do gene *Ephx2* de um modo tecido específico, e também que alterações no transcrito do gene nem sempre resulta em alterações da expressão e da atividade da enzima.

Ao contrário dos trabalhos citados acima (ZORDOKY et al., 2010; ZORDOKY et al., 2011), os resultados do presente estudo demonstraram que a DXR aumentou a expressão de mRNA do gene *Ephx2* em $1,85 \pm 0,28$ vezes no fígado e em $2,04 \pm 0,28$ vezes no rim comparado com o grupo controle (óleo mineral), mas no coração não houve alteração do padrão de expressão desse transcrito (Figura 24). A cascata do ácido araquidônico é complexa e envolve diversas vias de sinalização, e os EETs não são seus únicos metabólitos. As enzimas do citocromo P450 também produzem o ácido 20-hidroxieicosatrienoico (20-HETEs), que possuem efeitos opostos dos EETs, funcionando como pró-inflamatórios (MORISSEAU; HAMMOCK, 2012). Esses efeitos opostos dos metabólitos do ácido araquidônico são mediados por diversas cascatas de sinalização intracelular, que tem sido implicadas no desenvolvimento e/ou progressão de cardiotoxicidade, envolvendo, por exemplo, fatores de transcrição como NF- κ B (fator nuclear kappa B), com função na regulação da resposta imune; proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), que regulam transcrição, mitose, diferenciação e apoptose; e metaloproteinase de matriz (MM9) (ALSAAD et al., 2012). Considerando que diversos sinais intracelulares estão envolvidos nos processos de toxicidade induzida pela DXR e também no metabolismo do ácido araquidônico, investigações adicionais, como por exemplo, análise da expressão e da atividade da proteína sEH e avaliação das vias do citocromo P450, poderiam auxiliar no entendimento dos resultados obtidos no presente estudo.

Figura 24: Expressão relativa de mRNA do gene *Ephx2* em fígado, rim e coração de ratos tratados com a polpa liofilizada do piquiá (75 e 300 mg/kg p.c.) associada ou não a doxorrubicina (DXR, 15 mg/kg p.c.). ^aDiferente do grupo controle óleo mineral; ^bDiferente do grupo óleo + DXR. Teste t de *student*

Uma vez que os mecanismos de toxicidade da DXR são diferentes dos mecanismos antineoplásicos, muitos estudos têm sido realizados na tentativa de descobrir estratégias que protejam as células contra os danos induzidos pela DXR sem diminuir sua eficácia terapêutica (ALSAAD et al., 2012; CARVALHO et al., 2009). Recentemente, um dos mecanismos propostos na toxicidade da DXR é o metabolismo do ácido araquidônico (ZORDOKY et al., 2010). O ácido araquidônico é metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 em ácidos pró-inflamatórios 20-HETEs e anti-inflamatórios (ácidos graxos epóxi, EpFAs – *epoxide-fatty acids*), entre esses últimos destacam-se os EETs (Figura 25). Os EETs geralmente são mediadores químicos que regulam a homeostasia e seus principais efeitos são: analgésico, antifibrótico, antihipertensivo, vasodilatador, anti-inflamatório, antioxidante e regulação da glicemia. Por causa desses efeitos benéficos, os EETs tem se tornado alvos terapêuticos para o tratamento de várias doenças (MORISSEAU; HAMMOCK, 2012).

Figura 25: Cascata do ácido araquidônico enfatizando a conversão dos principais epóxidos anti-inflamatórios a seus 1,2-dióis pela enzima epóxido hidrolase solúvel (sEH). ARA: ácido araquidônico; CoA: coenzima A; COX: ciclo-oxigenase; CYP450: citocromo P450; DHETs: ácidos dihidroxi-eicosatrienoicos; DiHETEs: ácidos dihidroxi-eicosatetraenoicos; DiHOME: ácidos dihidroxi-octadecenoico; EETs: ácidos epoxieicosatrienoicos; EPA: ácido eicosapentaenoico; EpETEs: ácidos epoxieicosatetraenoicos; EpFAs: ácidos graxos epóxi; EpOMEs: ácidos epoxioctadecenoico; HETE: ácido hidroxi-eicosatetraenoico; LA: ácido linoleico; LOX: lipo-oxigenase; PLA2S: fosfolipase A2. Adaptado de Morisseau e Hammock (2012)

Uma vez que a enzima sEH converte os EETs à DHETs, que possuem menor atividade biológica, inibidores farmacológicos de sEH têm se tornado um alvo importante no tratamento de doenças crônicas inflamatórias, dor, hipertensão, arteriosclerose, hipertrofia cardíaca, hipertensão pulmonar, doença pulmonar crônica obstrutiva e diabetes (MORISSEAU; HAMMOCK, 2012). A repressão da transcrição do gene *Ephx2* também é um alvo importante para aplicações terapêuticas (TANAKA et al., 2008).

No presente trabalho, os grupos piquiá 75 + DXR e piquiá 300 + DXR apresentaram diminuição de $2,80 \pm 0,19$ e $1,89 \pm 0,33$ vezes, respectivamente, da transcrição do gene *Ephx2* no tecido hepático comparado com o grupo óleo + DXR. No rim, o grupo piquiá 75 + DXR apresentou redução de $1,81 \pm 0,37$ vezes da expressão relativa de mRNA do gene *Ephx2* comparado com o grupo óleo + DXR, enquanto que no grupo piquiá 300 mg/kg houve aumento do nível desse transcrito comparado com o grupo óleo mineral. No coração, esses efeitos foram diferentes, uma vez que o tratamento por si só com 300 mg/kg p.c. da polpa do piquiá

aumentou $4,04 \pm 1,09$ vezes a expressão de mRNA do gene *Ephx2* comparado com o grupo óleo mineral. Nesse mesmo tecido, a expressão de mRNA do *Ephx2* no grupo piquiá 300 + DXR foi $2,87 \pm 0,58$ vezes maior que o grupo óleo + DXR (Figura 24). Esses resultados demonstram que a polpa do piquiá regula a transcrição do gene *Ephx2*, e esse efeito foi tecido específico e também dose dependente.

Apesar de alguns trabalhos já terem demonstrado a regulação da transcrição do gene *Ephx2* por diversos fatores, não há estudos sobre os efeitos dos compostos bioativos da dieta na regulação da expressão desse gene. Administração de angiotensina II em ratos Wistar induziu a expressão de mRNA do gene *Ephx2* e da enzima sEH, e esse aumento foi relacionado com ativação do fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1) (Al et al., 2007). O tratamento agudo (24 horas) com arsênio III aumentou a expressão de mRNA do gene *Ephx2* e da enzima sEH em coração de camundongos (ANWAR-MOHAMED et al., 2012). Células Jurkat T apresentaram aumento da transcrição de *Ephx2* após 12 h de irradiação com raios gama, sendo esse aumento relacionado com indução do fator de transcrição NFκ-B (PARK et al., 2002). Recentemente, foi demonstrado *in vivo* (camundongos) e *in vitro* (células endoteliais humanas) que a homocisteína induz a expressão de mRNA do gene *Ephx2* e da proteína sEH e esse aumento foi relacionado com ativação do fator ativador 6 de transcrição (ATF6) (ZHANG et al., 2012). Em células HepG2 (células de hepatocarcinoma humano), a metilação do DNA diminuiu a transcrição do gene *Ephx2*, e essa repressão foi dependente do fator de transcrição SP-1 (ZHANG et al., 2010).

Outro mecanismo relacionado com a cardiotoxicidade da DXR é a indução de apoptose mediada por p53 (ZHU et al., 2009). Estudos demonstraram que tratamento com DXR aumentou a atividade da p53 (DAS et al., 2011; PATEL et al., 2010) e também a expressão de mRNA do gene *Tp53* em coração de roedores (AL-SHABANAH et al., 2012; SAYED-AHMED et al., 2010). Entretanto, os resultados do presente trabalho demonstraram que 24 horas após a administração de uma única dose de DXR (15 mg/kg p.c.) não houve alteração da expressão de mRNA do gene *Tp53* em nenhum dos tecidos avaliados (Figura 26), o que pode ser devido ao curto tempo de exposição a DXR, uma vez que os trabalhos citados acima utilizaram administração única com tempo de exposição de 48 horas (AL-SHABANAH et al., 2012), ou administração acumulativa de doses (doses de 3 mg/kg p.c., aplicadas por

um período de 11 dias) (SAYED-AHMED et al., 2010). Além do tempo de exposição, os efeitos cardiotoxicos da DXR demonstraram ser dependentes da dose. Sayed-Ahamed et al. (2010), verificaram que menores doses de DXR (6 e 12 mg/kg p.c.) aumentaram a expressão de mRNA do gene *Tp53*, enquanto que a maior dose (18 mg/kg p.c.) diminuiu esse transcrito. Embora muito seja conhecido sobre a apoptose induzida pela DXR mediada pela p53, os detalhes sobre as vias independentes de p53 ainda não são completamente esclarecidos. Por exemplo, células de osteosarcoma humano deficientes em p53 (Saos-2) apresentaram apoptose induzida pela DXR, e esse processo envolveu a geração de ROS, despolarização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo *c* e ativação de caspase 3 (TSANG et al., 2003).

Vários trabalhos têm demonstrado que compostos bioativos da dieta possuem efeitos cardioprotetores contra os danos induzidos pela DXR, e um dos mecanismos responsáveis por essa proteção é a inibição da transcrição do gene *Tp53* e também diminuição da atividade da p53 (ALKREATHY et al., 2012; CHOI et al., 2008; LUDKE et al., 2012; XIAO et al., 2012). No presente estudo, os grupos piquiá 300 + DXR apresentaram redução de $1,66 \pm 0,10$, $1,40 \pm 0,04$ e $1,95 \pm 0,03$ vezes da expressão do mRNA do gene *Tp53* no fígado, rim e coração, respectivamente, comparado com o grupo óleo + DXR. No rim, a expressão do mRNA do *Tp53* foi $1,98 \pm 0,07$ menor no grupo piquiá 300 mg/kg comparado com o grupo óleo mineral (Figura 26).

Figura 26: Expressão relativa de mRNA do gene *Tp53* em fígado, rim e coração de ratos tratados com a polpa liofilizada do piquiá (75 e 300 mg/kg p.c.) associada ou não a doxorrubicina (DXR, 15 mg/kg p.c.). ^aDiferente do grupo controle óleo mineral; ^bDiferente do grupo óleo + DXR. Teste t de *student*

A proteína supressora tumoral p53 possui funções essenciais no controle de quase todos os processos celulares, regulando a integridade e homeostasia de cada célula. As células dependem dos níveis e da atividade da p53, o que por sua vez, depende das características e da intensidade dos danos. Qualquer célula sob condições desfavoráveis ou que foram expostas a qualquer tipo de dano, precisa intensificar seus processos de reparo, ou parar a divisão ou até mesmo morrer. A p53 atua em todos esses níveis celulares, garantindo assim que as mutações ou os danos não sejam transmitidos para as outras células durante o processo de divisão. Por isso, a p53 é também chamada de “guardiã do genoma”. Os mecanismos pelos quais a p53 exerce seus efeitos dentro das células são amplos e complexos, envolvendo várias cascatas de sinalização e diversos componentes celulares. Além disso, os efeitos da p53 dependem do tipo celular (CHUMAKOV, 2007).

A principal atividade da p53 é através de sua função como fator de transcrição, induzindo ou inibindo a expressão de diversos tipos de genes. Além disso, possui função enzimática, atuando como exonuclease durante o reparo do DNA, ou como enzima reguladora, interferindo em numerosas cascatas de sinalização celular. Também atua diretamente na indução de apoptose. A perda ou deficiência da função do gene *Tp53* está relacionado com o desenvolvimento de diversas doenças, entre elas câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. Entretanto, hiperatividade de p53 também pode desregular funções celulares e consequentemente contribui para desenvolvimento de doenças (CHUMAKOV, 2007).

A estrutura da proteína p53 contém domínios para fatores de transcrição. A região N-terminal da p53 contém um domínio ativador de transcrição (TA) e um domínio adjacente SH3 rico em prolina. O terço central da proteína p53 é a região responsável pelo reconhecimento e pela ligação a elementos específicos ao DNA. Dessa forma, a p53 se liga ao DNA, interage com os componentes da maquinaria da transcrição inibindo ou ativando a expressão gênica. O domínio C-terminal da p53 é rico em resíduos de serina e arginina e serve como alvo para várias modificações como fosforilação, acetilação e ubiquitinação, o que afeta a estabilidade e a atividade da proteína. A transcrição de centenas de genes são regulados pela p53, entre eles genes de controle do ciclo celular (*CDK2*, *CDK4*, *BTG2*), genes de reparo do DNA (*XPC*, *DDB2*, *MSH2*), genes que participam da morte celular (*BLC2*,

APAF1) e genes antioxidantes (*GPX1*, *SOD2*, *PRX2*) (BUDANOV et al., 2002; CHUMAKOV, 2007; LAPTENKO; PRIVES, 2006).

Além da atividade de regulação da transcrição de genes, a proteína p53 pode afetar a morte celular atuando diretamente em proteínas que regulam a permeabilidade da membrana mitocondrial. Após ativação em resposta a estresses, como por exemplo danos ao DNA, p53 é deslocada até a mitocôndria, onde interage com proteínas apoptóticas ou anti-apoptóticas da família Bcl2, levando ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, liberação de citocromo c e indução de apoptose (CHUMAKOV, 2007; ERSTER et al., 2004).

Os compostos bioativos da dieta, como os fenois e carotenoides, têm sido apontados como os promotores da saúde por reduzir o desenvolvimento de diversos tipos de doenças. Vários são os mecanismos pelos quais esses compostos exercem proteção, entre eles as ações antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. Entretanto, os mecanismos anticâncer desses compostos parecem estar envolvidos com indução de apoptose das células tumorais pela inibição da DNA topoisomerase II e/ou pela redução de p53 (GALATI; O'BRIEN, 2004). Nesse contexto, Liu et al. (2011) demonstraram que o ácido gálico causou citotoxicidade, genotoxicidade e inibiu a expressão de mRNA de genes de reparo, entre eles o *TP53*, em cultura de células humanas de câncer de próstata (PC-3).

4.7.2 Expressão de mRNA dos genes *Ephx2* e *Tp53* em ratos tratados com o extrato etanólico da polpa do piquiá

Os resultados da expressão relativa de mRNA dos genes *Ephx2* e *Tp53* em fígado, rim e coração de ratos tratados com o extrato etanólico da polpa do piquiá estão representados nas figuras 27 e 28, respectivamente. O tratamento com a DXR aumentou em $2,07 \pm 0,22$ e $2,13 \pm 0,40$ vezes a transcrição do gene *Ephx2* no fígado e rim, respectivamente, comparado com o grupo controle água. Apenas no fígado o extrato do piquiá alterou a expressão de mRNA do gene *Ephx2*, sendo que, o grupo extrato apresentou aumento de $2,02 \pm 0,34$ vezes na expressão desse transcrito comparado com o grupo controle água, e na associação extrato piquiá + DXR houve aumento de $2,66 \pm 0,29$ vezes dos níveis de mRNA do gene *Ephx2* comparado com o grupo DXR. No coração, não houve diferença significativa entre

os grupos de tratamento (Figura 27). Quanto a expressão de mRNA do gene *Tp53*, apenas no coração o grupo extrato piquiá apresentou redução de $1,47 \pm 0,10$ vezes na expressão desse transcrito comparado com o grupo controle água (Figura 28).

Figura 27: Expressão relativa de mRNA do gene *Ephx2* em fígado, rim e coração de ratos tratados com o extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá (75 mg/kg p.c.) associada ou não a doxorubicina (DXR, 15 mg/kg p.c.). ^aDiferente do grupo controle óleo mineral; ^bDiferente do grupo óleo + DXR. Teste t de *student*

Figura 28: Expressão relativa de mRNA do gene *Tp53* em fígado, rim e coração de ratos tratados com o extrato etanólico da polpa liofilizada do piquiá (75 mg/kg p.c.) associada ou não a doxorubicina (DXR, 15 mg/kg p.c.). ^aDiferente do grupo controle óleo mineral. Teste t de *student*

A maioria das pesquisas tem investigado os benefícios da inibição farmacológica da enzima sEH ou da repressão transcricional do gene *Ephx2*, demonstrando esses mecanismos como potenciais alvos para aplicações terapêuticas (TANAKA et al., 2008). Entretanto, o aumento da expressão de *Ephx2* pode também oferecer benefícios em alguns casos. Por exemplo, camundongos com deleção do gene *Ephx2* apresentaram redução da taxa de sobrevivência após parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar (HUTCHENS et al., 2008). Apesar

de muitos estudos caracterizarem os benefícios dos EETs, como anti-inflamatórios, vasodilatadores, angiogênicos, analgésicos, anti-hipertensivos, pouco se sabe sobre a ação desses epóxidos na biologia do câncer (PANIGRAHY et al., 2011). Alguns estudos demonstraram que os EETs estimulam a angiogênese tumoral através da ativação de receptores de fatores de crescimento (EGFR) (MICHAELIS et al., 2003; WEBLER et al., 2008). Além disso, a expressão da enzima sEH geralmente está reduzida em tumores de tecido humano (ENAYETALLAH; FRENCH; GRANT, 2006).

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, sob as condições experimentais empregadas no presente estudo, podemos concluir que a polpa liofilizada do piquiá:

- ✓ Apresentou atividade antígeno-tóxica sobre os danos ao DNA induzidos pela DXR, sendo esse efeito tecido específico e dependente da dose;
- ✓ Diminuiu a peroxidação lipídica induzida pela DXR no tecido cardíaco e aumentou os níveis de GSH no fígado;
- ✓ A maior dose (300 mg/kg p.c.) aumentou a expressão de mRNA do gene *Ephx2* no rim e coração, enquanto que a menor dose (75 mg/kg p.c.) diminuiu a transcrição desse gene induzida pela DXR em fígado e rim;
- ✓ Diminuiu os níveis de mRNA do gene *Tp53* no grupo da associação de piquiá 300 mg/kg p.c. + DXR.

Em relação ao extrato etanólico da polpa do piquiá, podemos concluir que:

- ✓ Apresentou efeito genotóxico, mas não mutagênico;
- ✓ Induziu a peroxidação lipídica no tecido cardíaco;
- ✓ Aumentou a transcrição do gene *Ephx2* no tecido hepático;
- ✓ Diminuiu os níveis de mRNA do gene *Tp53* no tecido cardíaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, A. et al. Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling. **Chemical-Biological Interaction**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 1-13, 2007.

ABOUTABL, M. E. et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase confers cardioprotection and prevents cardiac cytochrome P450 induction by benzo(a)pyrene. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, New York, v. 57, n. 3, p. 273-281, 2011.

Al, D. et al. Angiotensin II up-regulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium *in vitro* and *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 21, p. 9018-9023, 2007.

AISSA, A. F. et al. Comparative study of beta-carotene and microencapsulated beta-carotene: Evaluation of their genotoxic and antigenotoxic effects. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 1418-1424, 2012.

AL-HARBI, M. M. Effect of captopril on the cytological and biochemical changes induced by adriamycin. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 209-212, 1993.

AL-SHABANAH, O. A. et al. Desferrioxamine Attenuates Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity through TGF-beta/Smad p53 Pathway in Rat Model. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v. 2012, p. 1-7, 2012.

ALEISA, A. M. et al. Effect of metformin on clastogenic and biochemical changes induced by adriamycin in Swiss albino mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 634, n. 1-2, p. 93-100, 2007.

ALKREATHY, H. M. et al. Mechanisms of Cardioprotective Effect of Aged Garlic Extract Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 11, n. 4, p. 364-370, 2012.

ALPSOY, S. et al. Antioxidant and anti-apoptotic effects of onion (*Allium cepa*) extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, 2011. No prelo.

ALSAAD, A. M. et al. Chronic Doxorubicin Cardiotoxicity Modulates Cardiac Cytochrome P450-Mediated Arachidonic Acid Metabolism in Rats. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 40, n. 11, p. 2126-2135, 2012.

ALSHABANAH, O. A. et al. Doxorubicin toxicity can be ameliorated during antioxidant L-carnitine supplementation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v. 3, n. 6, p. 428-433, 2010.

ALVES, J. M. et al. In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, 2012. No prelo.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, 2004.

ANANTHI, R.; CHANDRA, N.; SANTHIYA, S. T. Protective effect of *Hemidesmus indicus* R.Br. root extract against cisplatin-induced cytogenetic damage in mouse bone marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 1, p. 182-185, 2010.

ANTUNES, L. M.; TAKAHASHI, C. S. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 419, n. 1-3, p. 137-143, 1998.

ANWAR-MOHAMED, A. et al. Acute arsenic toxicity alters cytochrome P450 and soluble epoxide hydrolase and their associated arachidonic acid metabolism in C57Bl/6 mouse heart. **Xenobiotica**, v. 42, n. 12, p. 1235-1247, 2012.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR**. Carlsbad, 2004. Disponível em <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf>

AROLA, O. J. et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. **Cancer Research**, Chicago, v. 60, n. 7, p. 1789-1792, 2000.

ARUN, R. et al. Role of *Syzygium cumini* seed extract in the chemoprevention of *in vivo* genomic damage and oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 134, n. 2, p. 329-333, 2011.

BHATTACHARYA, S. Natural antimutagens: A review. **Research Journal of Medicinal Plant**, Lagos, v. 5, n. 2, p. 116-126, 2011.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOEIRA, J. M. et al. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 128, n. 2, p. 526-532, 2010.

BOKULIC, A. et al. The effect of apigenin on cyclophosphamide and doxorubicin genotoxicity *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, New York, v. 46, n. 5, p. 526-533, 2011.

- BOUTABET, K. et al. Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. **Indian Journal of Nephrology**, Ahmedabad, v. 21, n. 2, p. 101-106, 2011.
- BRUNE, M.; HALLBERG, L.; SKANBERG, A. B. Determination of Iron-Binding Phenolic Groups in Foods. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 56, n. 1, p. 128-131, 1991.
- BUCHHOLZ, T. A. et al. Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. **Journal of Cancer**, Wyoming, v. 8, n. 6, p. 461-468, 2002.
- BUDANOV, A. V. et al. Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability. **Oncogene**, Basingstoke, v. 21, n. 39, p. 6017-6031, 2002.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CARVALHO, C. et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 16, n. 25, p. 3267-3285, 2009.
- CHEMAT, F.; ZILL E, H.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.
- CHEN, H. M. et al. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 286, n. 2, p. 161-171, 2009.
- CHISTE, R. C. et al. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, n. 3, p. 1740-1749, 2012.
- CHISTE, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of Carotenoids and Phenolic Compounds from the Amazonian Fruit *Caryocar villosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, p. 5884-5892, 2012.
- CHOI, H. J. et al. Hexane/ethanol extract of *Glycyrrhiza uralensis* licorice suppresses doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 rat cardiac myoblasts. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, Maywood, v. 233, n. 12, p. 1554-1560, 2008.
- CHUMAKOV, P. M. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. **Biochemistry (Mosc)**, New York, v. 72, n. 13, p. 1399-1421, 2007.
- DA COSTA LOPES, L. et al. Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 189-198, 2000.

DA SILVA, F. C. et al. Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice on mice blood cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 7, p. 2275-2281, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DANESI, R. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v. 41, n. 6, p. 431-444, 2002.

DAS, J. et al. Taurine suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiac apoptosis in rat via up-regulation of PI3-K/Akt and inhibition of p53, p38-JNK. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 81, n. 7, p. 891-909, 2011.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academics Press Inc., 1976. p. 38-165.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 13, p. 5062-5072, 2007.

DE SOUZA, M. C. C. et al. Stability of unpasteurized and refrigerated orange juice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 3, p. 391-397, 2004.

ENAYETALLAH, A. E.; FRENCH, R. A.; GRANT, D. F. Distribution of soluble epoxide hydrolase, cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 in human malignant neoplasms. **Journal of Molecular Histology**, Dordrecht, v. 37, n. 3-4, p. 133-141, 2006.

ERSTER, S. et al. *In vivo* mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 24, n. 15, p. 6728-6741, 2004.

ESFAHANI, A. et al. Health effects of mixed fruit and vegetable concentrates: a systematic review of the clinical interventions. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 30, n. 5, p. 285-294, 2011.

FENECH, M. et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, Basel, v. 4, n. 2, p. 69-89, 2011.

FERGUSON, L. R. Antimutagenesis Studies: Where Have They Been and Where Are They Heading? **Genes and Environment**, Tokyo, v. 33, n. 3, p. 71-78, 2011.

FESTA, F. et al. Strong antioxidant activity of ellagic acid in mammalian cells *in vitro* revealed by the comet assay. **Anticancer Research**, Athens, v. 21, n. 6A, p. 3903-3908, 2001.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.

GANDHI, N. M.; NAIR, C. K. Protection of DNA and membrane from gamma radiation induced damage by gallic acid. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 278, n. 1-2, p. 111-117, 2005.

GAO, S. et al. Lutein and zeaxanthin supplementation reduces H₂O₂-induced oxidative damage in human lens epithelial cells. **Molecular Vision**, Atlanta, v. 17, p. 3180-3190, 2011.

GENE DATABASE. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene%3E>. Acesso em: 24 set. 2012

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 57, n. 7, p. 727-741, 1999.

GORDON, A. et al. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 14, p. 7688-7699, 2011.

GRADECKA-MEESTERS, D. et al. Assessment of the protective effects of selected dietary anticarcinogens against DNA damage and cytogenetic effects induced by benzo[a]pyrene in C57BL/6J mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 1674-1683, 2011.

GRANADOS-PRINCIPAL, S. et al. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 1425-1438, 2010.

GROVER, P. et al. *In vivo* assessment of genotoxic effects of *Annona squamosa* seed extract in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1964-1971, 2009.

HAMLAOUI, S. et al. Resveratrol protects against acute chemotherapy toxicity induced by doxorubicin in rat erythrocyte and plasma. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Kraków, v. 63, n. 3, p. 293-301, 2012.

HANEL, W.; MOLL, U. M. Links between mutant p53 and genomic instability. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 113, n. 2, p. 433-439, 2012.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HARTREE, E. F. Determination of Protein - Modification of Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HASHIMOTO, K. et al. Effect of glutathione (GSH) depletion on DNA damage and blood chemistry in aged and young rats. **The Journal of Toxicological Science**, Sapporo, v. 33, n. 4, p. 421-429, 2008.

HAYASHI, M. et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 234-252, 2000.

HAYASHI, M. et al. The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral-Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990.

HOLDEN, H. E.; MAJESKA, J. B.; STUDWELL, D. A direct comparison of mouse and rat bone marrow and blood as target tissues in the micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 391, n. 1-2, p. 87-89, 1997.

HSEU, Y. C. et al. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 1245-1255, 2012.

HU, M. L. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. **Chang Gung Medical Journal**, Taipei, v. 34, n. 5, p. 449-460, 2011.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, Houndmills, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005.

HUNG, H. C. et al. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 96, n. 21, p. 1577-1584, 2004.

HUTCHENS, M. P. et al. Soluble epoxide hydrolase gene deletion reduces survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. **Resuscitation**, London, v. 76, n. 1, p. 89-94, 2008.

INOUE, H. et al. High-dose green tea polyphenols induce nephrotoxicity in dextran sulfate sodium-induced colitis mice by down-regulation of antioxidant enzymes and heat-shock protein expressions. **Cell Stress and Chaperones**, New York, v. 16, n. 6, p. 653-662, 2011.

JAIN, D. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. **Journal of Nuclear Cardiology**, St Louis, v. 7, n. 1, p. 53-62, 2000.

KADIRVEL, R. et al. Supplementation of ascorbic acid and alpha-tocopherol prevents arsenic-induced protein oxidation and DNA damage induced by arsenic in rats. **Human and Experimental Toxicology**, Hundmills, v. 26, n. 12, p. 939-946, 2007.

KAHAN, V. et al. Sleep loss induces differential response related to genotoxicity in multiple organs of three different mice strains. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, Copenhagen, v. 107, n. 1, p. 598-602, 2010.

KANG, Y. J. The antioxidant function of metallothionein in the heart. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 222, n. 3, p. 263-273, 1999.

KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 115, n. 2, p. 81-103, 2007.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 140-141, p. 63-74, 2003.

KNASMULLER, S. et al. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 1051-1062, 2002.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, Amsterdam v. 455, n. 1-2, p. 155-166, 2000.

KUPPAN, G. et al. Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes. **Cytokine**, Philadelphia, v. 49, n. 2, p. 229-234, 2010.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 539, n. 1-2, p. 127-135, 2003.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T.; FALCIONI, G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 539, n. 1-2, p. 19-28, 2003.

LAL, S. et al. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 11, n. 1, p. 115-128, 2010.

LAPTENKO, O.; PRIVES, C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 13, n. 6, p. 951-961, 2006.

LARSSON, C. et al. Localization of the human soluble epoxide hydrolase gene (ephx2) to chromosomal region 8p21-p12. **Human Genetics**, Berlin, v. 95, n. 3, p. 356-358, 1995.

LEBRECHT, D. et al. Dexrazoxane prevents doxorubicin-induced long-term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats. **British Journal of Psychiatry**, London, v. 151, n. 6, p. 771-778, 2007.

LIU, K. C. et al. Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostate cancer PC-3 cells. **Environmental Toxicology**, New York, 2011. No prelo.

LUDKE, A. et al. Subcellular basis of vitamin C protection against doxorubicin-induced changes in rat cardiomyocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 360, n. 1-2, p. 215-224, 2012.

LUDKE, A. R. et al. A concise description of cardioprotective strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 87, n. 10, p. 756-763, 2009.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. beta-Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports**, London, v. 9, n. 9, p. 783-789, 1985.

MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology**, Berlin, v. 204, n. 6, p. 442-444, 1997.

MICHAELIS, U. R. et al. Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce angiogenesis via cross-talk with the epidermal growth factor receptor (EGFR). **FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 17, n. 6, p. 770-772, 2003.

MIHM, M. J. et al. Intracellular distribution of peroxynitrite during doxorubicin cardiomyopathy: evidence for selective impairment of myofibrillar creatine kinase. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 135, n. 3, p. 581-588, 2002.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 56, n. 2, p. 185-229, 2004.

MOKNI, M. et al. Grape seed and skin extract protects against acute chemotherapy toxicity induced by doxorubicin in rat heart. **Cardiovascular Toxicology**, Totowa, v. 12, n. 2, p. 158-165, 2012.

MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, 2012. No prelo.

- MUKHOPADHYAY, P. et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death *in vivo* and *in vitro*. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 296, n. 5, p. H1466-1483, 2009.
- NUNES, R. S. et al. Antigenotoxicity and antioxidant activity of acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at two stages of ripeness. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 66, n. 2, p. 129-135, 2011.
- OCTAVIA, Y. et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 52, n. 6, p. 1213-1225, 2012.
- ODA, E. et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. **Science**, New York, v. 288, n. 5468, p. 1053-1058, 2000.
- OSOWSKI, A. et al. Natural Compounds in the human diet and their ability to bind mutagens prevents DNA-mutagen intercalation. **Journal of Toxicology and Environmental Health: Part A**, Washington, v. 73, n. 17-18, p. 1141-1149, 2010.
- PANIGRAHY, D. et al. EET signaling in cancer. **Cancer Metastasis Review**, The Hague, v. 30, n. 3-4, p. 525-540, 2011.
- PARK, W. Y. et al. Identification of radiation-specific responses from gene expression profile. **Oncogene**, Basingstoke, v. 21, n. 55, p. 8521-8528, 2002.
- PATEL, N. et al. Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 245, n. 2, p. 143-152, 2010.
- PETERSON, C.; TROUET, A. Transport and storage of daunorubicin and doxorubicin in cultured fibroblasts. **Cancer Research**, Chicago, v. 38, n. 12, p. 4645-4649, 1978.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.
- PRASAD, S. et al. Protective effects of lupeol against benzo[a]pyrene induced clastogenicity in mouse bone marrow cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 52, n. 10, p. 1117-1120, 2008.
- RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, p. 83-85, 1991.
- RAMOS, D. L. et al. Genotoxic effects of doxorubicin in cultured human lymphocytes with different glutathione S-transferase genotypes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 724, n. 1-2, p. 28-34, 2011.

RASHIKH, A. et al. Protective effects of aliskiren in doxorubicin-induced acute cardiomyopathy in rats. **Human and Experimental Toxicology**, Houndmills, v. 30, n. 2, p. 102-109, 2011.

RAUSCHER, R.; EDENHARDER, R.; PLATT, K. L. *In vitro* antimutagenic and *in vivo* anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 413, n. 2, p. 129-142, 1998.

RAYMAEKERS, M. et al. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 23, n. 3, p. 145-151, 2009.

RIBEIRO, J. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea Mart.*) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 695, n. 1-2, p. 22-28, 2010.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K. **Mutagênese ambiental**. 1 ed. Canoas: Ulbra, 2006. p. 201-219.

ROTHFUSS, A. et al. Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 723, n. 2, p. 108-120, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold, Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2028 p.

SANCHEZ-LAMAR, A. et al. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum L.* (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 115, n. 3, p. 416-422, 2008.

SAYED-AHMED, M. M. et al. Inhibition of gene expression of heart fatty acid binding protein and organic cation/carnitine transporter in doxorubicin cardiomyopathic rat model. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 640, n. 1-3, p. 143-149, 2010.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SELLERS, R. S. et al. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. **Toxicology Pathology**, Newark, v. 35, n. 5, p. 751-755, 2007.

SERPELONI, J. M. et al. Lutein improves antioxidant defense *in vivo* and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 84, n. 10, p. 811-822, 2010.

SIMUNEK, T. et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacological Reports**, Kraków, v. 61, n. 1, p. 154-171, 2009.

SINGH, N. P. et al. 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.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASSA, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, 2012. No prelo.

TAKEUCHI, P. L.; ANTUNES, L. M.; TAKAHASHI, C. S. Modulation of doxorubicin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells by vitamin B(6). **Archives Toxicology**, Berlin, v. 82, n. 11, p. 869-873, 2008.

TANAKA, H. et al. Transcriptional regulation of the human soluble epoxide hydrolase gene *EPHX2*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1779, n. 1, p. 17-27, 2008.

TAVARES, D. C. et al. Antimutagenic potential of *Solanum lycocarpum* against induction of chromosomal aberrations in V79 cells and micronuclei in mice by doxorubicin. **Planta Med**, Stuttgart, v. 77, n. 13, p. 1489-1494, 2011.

TEWEY, K. M. et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science**, New York, v. 226, n. 4673, p. 466-468, 1984.

THIPPESWAMY, A. H. et al. Protective role of *Phyllanthus niruri* extract in doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, Pondicherry, v. 43, n. 1, p. 31-35, 2011.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TORRES, V. M. et al. Fullerenol C60(OH)24 prevents doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. **Pharmacological Reports**, Kraków, v. 62, n. 4, p. 707-718, 2010.

TRIVEDI, P. P. et al. Cardioprotective effects of hesperetin against doxorubicin-induced oxidative stress and DNA damage in rat. **Cardiovascular Toxicology**, Totowa, v. 11, n. 3, p. 215-225, 2011.

TSANG, W. P. et al. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. **Life Sciences**, Oxford, v. 73, n. 16, p. 2047-2058, 2003.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAPA, I. et al. Effect of fulleranol C(60)(OH) (24) on lipid peroxidation of kidneys, testes and lungs in rats treated with doxorubicine. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Paris, v. 37, n. 4, p. 301-307, 2012.

VENKATESH, P. et al. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: a micronucleus study. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand, v. 6, n. 1, p. 42-53, 2007.

VIEIRA, P. M.; SANTOS, S. C.; CHEN-CHEN, L. Assessment of mutagenicity and cytotoxicity of *Solanum paniculatum* L. extracts using *in vivo* micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 3, p. 601-606, 2010.

VURUSANER, B.; POLI, G.; BASAGA, H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 52, n. 1, p. 7-18, 2012.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Science, Inc, 1994. 238 p.

WATERS, M. D. et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990.

WEBLER, A. C. et al. Epoxyeicosatrienoic acids are part of the VEGF-activated signaling cascade leading to angiogenesis. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 295, n. 5, p. C1292-1301, 2008.

WEINSTEIN, D. M.; MIHM, M. J.; BAUER, J. A. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 294, n. 1, p. 396-401, 2000.

WINCZURA, A.; ZDZALIK, D.; TUDEK, B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 46, n. 4, p. 442-459, 2012.

WOLFSEGGGER, M. J. et al. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 240, n. 1, p. 117-122, 2009.

XIAO, J. et al. Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity *in vivo* and *in vitro*. **Toxicology**, Amsterdam, v. 292, n. 1, p. 53-62, 2012.

YALCIN, E. et al. Protective role of grape seed extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity and genotoxicity in albino mice. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 13, n. 4, p. 917-925, 2010.

YOU, B. R.; PARK, W. H. Gallic acid-induced human pulmonary fibroblast cell death is accompanied by increases in ROS level and GSH depletion. **Drug and Chemical Toxicology**, New York, v. 34, n. 1, p. 38-44, 2011.

ZHANG, D. et al. DNA methylation of the promoter of soluble epoxide hydrolase silences its expression by an SP-1-dependent mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1799, n. 9, p. 659-667, 2010.

ZHANG, D. et al. Homocysteine upregulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium *in vitro* and *in vivo*. **Circulation Research**, Baltimore, v. 110, n. 6, p. 808-817, 2012.

ZHAO, T. T. et al. Soluble epoxide hydrolase and ischemic cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 155, n. 2, p. 181-187, 2012.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, Barking, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

ZHU, W. Q. et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. **Circulation**, Dallas, v. 119, n. 1, p. 99-U195, 2009.

ZORDOKY, B. N. et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity alters cardiac cytochrome P450 expression and arachidonic acid metabolism in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 242, n. 1, p. 38-46, 2010.

ZORDOKY, B. N. et al. Acute doxorubicin toxicity differentially alters cytochrome P450 expression and arachidonic acid metabolism in rat kidney and liver. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, Bethesda, v. 39, n. 8, p. 1440-1450, 2011.

ZUNINO, F. et al. Interaction of daunomycin and its derivatives with DNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 277, n. 3, p. 489-498, 1972.

ANEXO

ANEXO

ANEXO A- Certificado CEUA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

CÓPIA

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.1151.53.3), intitulado "Avaliação da Citotoxicidade, Genotoxicidade e Antigenotoxicidade e Expressão dos Genes TP53 e EPHX2 em Ratos Tratados com Extrato de *Caryocar villosum*", de autoria de **Mara Ribeiro de Almeida** e de **Maria de Lourdes Pires Bianchi** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do **Campus de Ribeirão Preto – USP** foi aprovado *ad referendum* da reunião da CEUA.

This is to certify that the work (Protocol number 09.1.1151.53.3), entitled: "Avaliação da Citotoxicidade, Genotoxicidade e Antigenotoxicidade e Expressão dos Genes TP53 e EPHX2 em Ratos Tratados com Extrato de *Caryocar villosum*", by **Mara Ribeiro de Almeida** and **Maria de Lourdes Pires Bianchi**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved *ad referendum* in the meeting of the CEUA..

Ribeirão Preto, 19 de fevereiro de 2010.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Recebi o original
Data 23.02.2010
Ass: