UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e
expressão dos genes *iNos* e *COX-2* em ratos tratados com a polpa do
fruto de *Solanum sessiliflorum* Dunal

Lívia Cristina Hernandez

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e expressão dos genes *iNos* e *COX-2* em ratos tratados com a polpa do fruto de *Solanum sessiliflorum* Dunal

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Lívia Cristina Hernandes

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

Ribeirão Preto

2013

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.

Hernandes, Livia Cristina

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e expressão dos genes *iNos* e *COX-2* em ratos tratados com a polpa do fruto de *Solanum sessiliflorum* Dunal. Ribeirão Preto, 2013.

90 p. : il.; 30 cm

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

Orientadora: Antunes, Lusânia Maria Gregg

1. Maná-cubiu. 2. Doxorrubicina. 3. Mutagênese. 4. Carotenoides. 5. Compostos fenólicos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lívia Cristina Hernandez

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e expressão dos genes *iNos* e *COX-2* em ratos tratados com a polpa do fruto de *Solanum sessiliflorum* Dunal

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

Área de concentração: Toxicologia

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Paulo e Augusta, meus irmãos Breno e Marina e minha linda Bianquinha.

AGRADECIMENTOS

Apreendi que devemos sempre agradecer em primeiro lugar a **Deus**, por ser o progenitor da vida, pelas oportunidades preciosas concedidas por Ele para o aprendizado e evolução constantes, por seu Amor Infinito que me envolve todos os dias, fortalecendo meu coração diante de todas as vicissitudes da vida.

Aos meus queridos pais, **Paulo Hernandes Silva e Maria Augusta Almeida Hernandes**. Pai, o seu exemplo de fé, humildade e caridade foi imprescindível para a edificação da minha base moral. As suas vigas construídas com o cimento do amor e carinho constituem o sustentáculo de nossa família a despeito de qualquer carga. Mãe, o seu amor e sua doçura cativante podem ser sentidos mesmo a quilômetros de distância, envolvendo sempre o meu coração em seu carinho angelical. Muito obrigada pelo apoio e pelas palavras de incentivo, como: “Lívia, você tem que ser independente, ter uma profissão, ter seu dinheirinho, não depender de marido.” Bom, mãe, acredito que estou seguindo seu conselho e trilhando meu futuro. Agradeço a vocês pelas preces diárias direcionadas a mim e aos meus irmãos que são como um bálsamo para minha Alma. Muito obrigada por tudo!

Aos meus irmãos **Marina Hernandes Silva e Breno Hernandes Silva**. Para mim, é uma satisfação imensa ter vocês como irmãos e agradeço sempre o exemplo de perseverança de cada um: a Marina por ser uma guerreira, corajosa, estudiosa e vitoriosa em todos os sentidos e o Breno por conquistar o coração de todos ao seu redor, pela alegria contagiante e pelo esforço e dedicação incessantes.

À minha sobrinha **Bianca Hernandes Silva**, que com seu sorriso cativante e doce me encanta e surpreende constantemente, proporcionando sempre um novo motivo para alegrar meu dia.

À minha orientadora **Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes**, que me introduziu o universo intrigante da pesquisa na minha iniciação científica e permitiu que eu me encantasse pela Nutrigenômica. Em nossas vidas estamos rodeados de

exemplos do campo profissional ao afetivo, os quais simbolizam uma referência para atingirmos nossos sonhos. Você, Lusânia, representa para mim, um modelo de profissional bem-sucedida, mestre e orientadora. Muito obrigada pela dedicação e paciência a mim conferidas, pelo auxílio e disponibilidade em todos os momentos que foram essenciais para a concretização deste trabalho e para minha formação acadêmica.

À **Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi**, que não mede esforços para aprimorar sempre a infraestrutura do nosso Laboratório de Nutrigenômica, e pelo apoio e conselhos fundamentais para a melhor condução deste trabalho.

À **Profa. Dra. Adriana Mercadante Zerlotti** da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pela parceria com nosso laboratório e por disponibilizar a polpa liofilizada do maná-cubiu utilizada neste estudo.

Ao **Dr. Eliseu Rodrigues** da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela confecção e envio da polpa liofilizada do maná-cubiu, e por sempre ser solícito com minhas várias dúvidas.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrigenômica **Joana D'arc Castania Darin, Regislaine Valéria Burim e Jefferson Codognotto**, pelo convívio diário e por sempre estarem disponíveis a ajudar-me, em especial à Joana D'arc por me transmitir a calma e a segurança necessárias na realização dos experimentos.

Ao **Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa** do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto por disponibilizar seu laboratório para a realização dos experimentos de PCR em tempo real, e às funcionárias **Fabíola Singaretti de Oliveira e Milla Sprone Tavares** por toda a ajuda e disponibilidade na realização dos experimentos de PCR.

Ao **Dr. Bruno Lemos Batista** e à **Ms. Eloísa Silva de Paula** do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) pela realização da análise dos minerais presentes na polpa do maná-cubiu.

Aos amigos do Laboratório de Nutrigenômica **Tarsila Gomes, Carla Machado, Vinícius Venâncio, Farah Chequer, Bruno Franco, Michella Bianchi, Maíra Prado**, por serem uma excelente equipe sem a qual a realização deste trabalho não seria possível. Em especial ao **Alexandre Ferro Aissa**, que desde a iniciação científica esteve ao meu lado sempre disposto a esclarecer qualquer dúvida, sugerindo novas ideias para aprimorar nosso grupo de pesquisa, e à **Mara Ribeiro de Almeida**, que desde o princípio deste trabalho esteve sempre disposta a me transmitir todo seu conhecimento, como na orientação de cálculos de dosagem, na correção de relatórios, na participação nos experimentos, enfim. Além de ser essencial na concretização deste estudo, você, Mara, é muito especial em minha vida pela sua amizade, proporcionando vários momentos memoráveis!

Ao **Luiz Fabiano Aguiar**, que sempre escutava com muito carinho e atenção todas as minhas aflições e dúvidas, pelo bom humor e alegria constantes que servem como bálsamo ao meu coração.

A todos os meus verdadeiros amigos que sempre me incentivaram com palavras carinhosas, mensagens de ânimo e coragem, especialmente agradeço à **Marina Rezende, Bárbara Boretti, Gisele Monteiro, Pâmella Alves, Mariana Gomes, Irmay Ferreira, Larissa Sampaio, Naianna Lúcio, Flávia Azevedo e Janaína Galvão**.

Aos funcionários da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP)**, que me acolheram com tanto carinho na graduação e pós-graduação.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro concedido a esse estudo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro.

“Ama, trabalha, espera e perdoa.”
 (“Paulo e Estevão” de Emmanuel)

RESUMO

HERNANDES, L.C. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e expressão dos genes *iNos* e *COX-2* em ratos tratados com a polpa do fruto de *Solanum sessiliflorum* Dunal.** 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O cubiuzeiro (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é uma planta nativa da Amazônia, utilizada na medicina popular no tratamento de queimaduras e no controle da glicemia e colesterolemia. Análises fitoquímicas da polpa dos frutos do cubiuzeiro, conhecidos como maná-cubiu, revelaram que este apresenta em sua constituição carotenoides, compostos fenólicos e vitaminas. Devido aos poucos estudos sobre a atividade biológica do fruto e à presença de compostos com propriedades antioxidantes, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos da polpa do maná-cubiu sobre a estabilidade genômica, parâmetros de estresse oxidativo, expressão de genes pró-inflamatórios (*iNos* e *COX-2*) em ratos Wistar e determinar a presença de elementos químicos na polpa liofilizada por ICP-MS. Os animais receberam, por gavagem, a polpa liofilizada do maná-cubiu (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.) durante 14 dias. No último dia de tratamento foi administrada intraperitonealmente salina ou doxorubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.), usada como agente indutor de danos, e após 24 horas os animais foram eutanasiados. O sangue periférico e a medula óssea foram usados no teste do micronúcleo. No ensaio do cometa foram analisados fígado, coração e sangue periférico. Fígado e coração foram utilizados nas análises das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona reduzida (GSH) e na avaliação da expressão de RNAm dos genes *COX-2* e *iNos*. Os resultados mostraram que a polpa do maná-cubiu não foi mutagênica nem citotóxica à medula óssea e ao sangue periférico dos animais. Nas doses 250 e 375 mg/kg p.c., a polpa do maná-cubiu reduziu o número de células micronucleadas induzidas pela DXR no sangue periférico, enquanto que na medula óssea somente a dose de 375 mg/kg p.c. foi antimutagênica. A polpa do maná-cubiu não foi genotóxica no fígado, coração e sangue periférico, e os animais tratados com a associação da polpa do maná-cubiu e DXR apresentaram uma redução de danos ao DNA. Nas doses de 250, 375 e 500 mg/kg p.c., a polpa do maná-cubiu foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica induzida pela DXR em células hepáticas, mas não alterou as concentrações de GSH no fígado e no coração. Os dados obtidos da reação em cadeia da polimerase em tempo real referentes ao gene *COX-2* mostraram que a polpa do maná-cubiu não modulou a transcrição deste gene. Ainda, a polpa liofilizada do maná-cubiu apresentou em sua composição a presença de elementos-traço como zinco, manganês, selênio, cobre e cromo, mas não em quantidades significativas. Os compostos bioativos presentes na polpa do maná-cubiu, como carotenoides e compostos fenólicos, podem estar relacionados com os efeitos protetores em certos tecidos e doses de maná-cubiu observados neste estudo.

Palavras-chave: maná-cubiu, doxorubicina, carotenoides, compostos fenólicos, mutagênese

ABSTRACT

HERNANDES, L.C. **Cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity evaluations and gene expression of *iNos* and *COX-2* in rats treated with the fruit pulp of *Solanum sessiliflorum* Dunal.** 2013. 90 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Cubiuzeiro (*Solanum sessiliflorum* Dunal) is a native plant from Amazonian Forest, used in folk medicine to treat burns and to control cholesterol and blood glucose levels. Phytochemical analysis of the cubiuzeiro fruit, known as maná-cubiu, revealed that its composition exhibits carotenoids, phenolic compounds and vitamins. Due to the few studies that have assessed the biological activity and the presence of compounds with antioxidant properties in this fruit, the objectives of this study were to evaluate the effects of maná-cubiu pulp on genomic stability, oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory genes (*iNos* and *COX-2*) in Wistar rats and to determine the presence of chemical elements in the lyophilized pulp by ICP-MS. The animals received lyophilized maná-cubiu pulp (125, 250, 375 or 500 mg/kg b.w.) by gavage for 14 days. On the last day of treatment, saline or doxorubicin (DXR, 16 mg/kg b.w.), used as a genotoxic agent, were administered intraperitoneally, and after 24 hours the animals were euthanized. Peripheral blood and bone marrow were used in the micronucleus test. In the comet assay, liver, heart and peripheral blood cells were analyzed. Liver and heart tissues were used to analyze the thiobarbituric acid reactive substances and reduced glutathione (GSH) and to evaluate the mRNA expression of *COX-2* and *iNos* genes. The results showed that maná-cubiu pulp was not mutagenic or cytotoxic in bone marrow and peripheral blood of the animals. At 250 and 375 mg/kg b.w. doses, the maná-cubiu pulp reduced the number of micronucleated cells induced by DXR in peripheral blood, while only the 375 mg/kg b.w. dose was antimutagenic in bone marrow cells. The maná-cubiu pulp was not genotoxic on liver, heart and peripheral blood cells, and the animals treated with maná-cubiu and DXR exhibited lower levels of DNA damage. At 250, 375 and 500 mg/kg b.w. doses, maná-cubiu pulp was able to reduce lipidic peroxidation induced by DXR on liver cells, however did not change the GSH levels on heart and liver cells. The data obtained by real time polymerase chain reaction (RT-qPCR) from *COX-2* gene showed that maná-cubiu pulp did not alter the expression of this gene. Also, the maná-cubiu pulp presented trace elements as zinc, manganese, selenium, copper and chromium, but not in significant amounts. Bioactive compounds in the maná-cubiu pulp as carotenoids and phenolic compounds may be associated with the protective effect in certain tissues and doses of maná-cubiu shown in this study.

Keywords: maná-cubiu, doxorubicin, carotenoids, phenolic compounds, mutagenesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fruto maná-cubiu.	2
Figura 2. Fotomicrografias obtidas no teste do micronúcleo em células da medula óssea (A) e do sangue periférico (B) de ratos Wistar.	7
Figura 3. Fotomicrografias de nucleoides sem migração de DNA (A) e com migração formando cauda (B) obtidos de células do fígado de ratos Wistar na análise do ensaio cometa em microscópio de fluorescência.	9
Figura 4. Delineamento experimental.	21
Figura 5. Curvas de dissociação dos genes <i>Rps29</i> , <i>Actb</i> , <i>COX-2</i> e <i>iNos</i> com apenas um pico de amplificação, mostrando a especificidade dos <i>primers</i>	27
Figura 6. Variação da massa corpórea (diferença entre a massa corpórea final e a inicial) de ratos Wistar tratados com diferentes doses da polpa de maná-cubiu (MC 125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.) associada ou não à doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.).	32
Figura 7. Valores médios $\pm$ desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda (%DNA) em células do coração, fígado e sangue de ratos Wistar tratados com a polpa do maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.).	44
Figura 8. Estrutura química dos compostos carotenoides majoritários presentes na polpa do maná-cubiu.	48
Figura 9. Avaliação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em fígado e coração de ratos Wistar tratados com a polpa do maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.).	52
Figura 10. Avaliação das concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado e coração de ratos Wistar tratados com a polpa do maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.).	53

Figura 11. Avaliação qualitativa da integridade do RNA total em gel de agarose (1%) de amostras de fígado (em A) e coração (em B) de ratos Wistar.....	57
Figura 12. Expressão relativa de RNAm do gene COX-2 em fígado de ratos Wistar tratados com polpa de maná-cubiu (MC 375 mg/kg p.c.) associada ou não à doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados nas reações de RT-qPCR e o tamanho dos fragmentos amplificados (amplicon)	27
Tabela 2 - Relação, em porcentagem, entre massa do fígado/ massa corpórea e massa coração/ massa corpórea de ratos Wistar tratados com diferentes doses da polpa de maná-cubiu (MC 125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.) associada ou não à doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.).....	34
Tabela 3 - Relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos totais (PCE+NCE) na medula óssea de ratos Wistar tratados com a polpa de maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.)	36
Tabela 4 - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea e reticulócitos micronucleados (MNRET) no sangue periférico de ratos Wistar tratados com a polpa do maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.)	39
Tabela 5 - Média da viabilidade celular, em porcentagem, de coração e fígado de ratos Wistar tratados com a polpa do maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.).....	43
Tabela 6 - Quantificação do RNA total e razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} de amostras de fígado de ratos Wistar tratados com polpa de maná-cubiu (MC 375 mg/kg p.c.) associada ou não à doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.).....	56
Tabela 7 - Quantificação do RNA total e razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} de amostras de coração de ratos Wistar tratados com polpa de maná-cubiu (MC 375 mg/kg p.c.) associada ou não à doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.)	56
Tabela 8 - Determinação dos elementos químicos presentes na polpa liofilizada do maná-cubiu por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%DNA	Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides
<i>Actb</i>	Gene <i>actin, beta</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
cDNA	DNA complementar sintetizado pela enzima transcriptase reversa
COX-2	Gene <i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
Cq	<i>Quantification cycle</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DXR	Doxorrubicina
E	Eficiência da amplificação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GSH	Glutathiona Reduzida
IDR	Ingestão Diária Recomendada
<i>iNos</i>	Gene <i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i>
i.p.	Intraperitoneal
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
MDA	Malondialdeído
MN	Micronúcleo
MNPCE	Micronúcleo em Eritrócito Policromático
MNRET	Micronúcleo em Reticulócito
NCE	Eritrócito Normocromático
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.b	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
p.c.	peso corpóreo
PCE	Eritrócito Policromático
<i>Pgts2</i>	Gene <i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
<i>Rps29</i>	Gene <i>ribosomal protein S29</i>
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas e Siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	2
1.2 O antitumoral doxorubicina	4
1.3 Avaliação de danos ao DNA	6
1.4 Biomarcadores de estresse oxidativo	9
1.5 Genes óxido nítrico sintase indutível (<i>iNos</i>) e ciclooxigenase-2 (<i>COX-2</i>)	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Maná-cubiu	18
3.2 Fármaco e reagentes	18
3.3 Animais	19
3.4 Seleção das doses da polpa do maná-cubiu	19
3.5 Delineamento experimental	20
3.6 Teste do micronúcleo em células da medula óssea	21
3.7 Teste do micronúcleo em sangue periférico	23
3.8 Ensaio do cometa em coração, fígado e sangue periférico	23
3.9 Análise das concentrações de TBARS e GSH no fígado e coração de ratos	24
3.10 Análise da expressão de RNAm dos genes <i>iNos</i> e <i>COX-2</i> em coração e fígado de ratos	25
3.10.1 Extração de RNA	25
3.10.2. Avaliação quantitativa e qualitativa do RNA total	26
3.10.3 Síntese do cDNA	26
3.10.4 <i>Primers</i>	26
3.10.5 RT-qPCR	28
3.10.6 Eficiência da amplificação	28

3.11 Determinação dos elementos químicos presentes na polpa do maná-cubiu	29
3.12 Análise Estatística	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Variação de massa corpórea e massa relativa do coração e fígado	32
4.2 Teste do micronúcleo	36
4.2.1 Avaliação da citotoxicidade da polpa do maná-cubiu	36
4.2.2 Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade da polpa de maná-cubiu em células da medula óssea e sangue periférico.....	38
4.3 Ensaio do cometa.....	42
4.3.1 Avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade no coração, fígado e sangue periférico.....	42
4.4 Análise das concentrações de TBARS e GSH no fígado e coração de ratos.....	48
4.5 Análise da expressão relativa do RNAm do gene COX-2	53
4.5.1 Avaliação qualitativa e quantitativa do RNA total	55
4.5.2 Análise da expressão relativa de RNAm do gene COX-2	57
4.6 Determinação dos elementos químicos presentes na polpa do maná-cubiu.....	62
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS	69
ANEXO	90

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o interesse da população por uma alimentação saudável intensificou a busca por alimentos e compostos isolados com propriedades quimiopreventivas. Vários estudos sugerem que o consumo de frutas, hortaliças e grãos integrais diminui o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (SALAS-SALVADO et al., 2011; TEMPLE; GLADWIN, 2003). Essa relação pode estar associada à presença de macronutrientes, micronutrientes e compostos bioativos nos alimentos, como vitaminas, ácidos graxos, carotenoides e compostos fenólicos, os quais atuam por diferentes mecanismos na proteção do organismo.

A incidência de doenças em algumas regiões parece ser influenciada amplamente pelo estilo de vida e a dieta (PARKIN; KHLAT, 1996). Na França, o consumo de vinho tinto tem sido relacionado a uma menor incidência de doenças cardiovasculares (HARIKUMAR; AGGARWAL, 2008). Estudos indicam que mulheres asiáticas apresentam menor risco de desenvolvimento de câncer de mama, devido ao consumo habitual de soja (WU et al., 2008). Habitantes do Sul da Europa e Norte da África, que possuem como base a dieta Mediterrânea, rica em frutas, hortaliças e azeite de oliva, apresentam também um menor risco de desenvolvimento de doenças crônicas incluindo doenças cardiovasculares e o câncer (ORTEGA, 2006).

Apesar dos efeitos benéficos já demonstrados pela ingestão de alimentos de origem vegetal, como frutas, alguns estudos têm identificado que a população brasileira consome uma quantidade inferior destes alimentos em relação à recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) que é de 400 gramas ao dia, ou cinco porções diárias de frutas e hortaliças (JAIME et al., 2009). No município de Ribeirão Preto (SP), uma pesquisa realizada com a população urbana em 2006 mostrou que apenas 24% dos homens e 38% de mulheres consumiam a quantidade mínima de frutas e hortaliças proposta pela OMS (MONDINI et al., 2010).

Dentre os compostos bioativos encontrados nos alimentos, carotenoides e compostos fenólicos têm sido amplamente pesquisados nos últimos anos, sendo evidenciados efeitos protetores frente a agentes indutores de danos ao DNA (CHEN; KONG, 2005).

Por outro lado, acredita-se ainda que a dieta possa contribuir para o aumento do risco de câncer. Estimativas indicam que entre 90-95% dos cânceres estão relacionados a fatores ambientais e ao estilo de vida, incluindo hábitos alimentares (ANAND et al., 2008). A ingestão de compostos mutagênicos como nitratos, nitrosaminas, praguicidas e micotoxinas pode ser proveniente de alimentos e estas substâncias podem alterar o funcionamento normal da célula, desencadeando inúmeros processos patológicos, inclusive o desenvolvimento do câncer (ANAND et al., 2008; PRESTON, 2007). Assim, o estudo dos possíveis efeitos mutagênicos dos alimentos é de grande importância na prevenção de doenças e na promoção da saúde.

1.1 *Solanum sessiliflorum* Dunal

A Amazônia destaca-se por sua inigualável variedade de espécies vegetais, muitas delas pouco exploradas pela comunidade científica, assim como ocorre com o cubiuzeiro (*Solanum sessiliflorum* Dunal). Pertencente à família Solanaceae, o cubiuzeiro pode ser encontrado em toda Amazônia Brasileira, Peruana e Colombiana. O fruto do cubiuzeiro é conhecido como “cocona” na Venezuela e Colômbia, “topiro” no Peru, “peach-tomato” nos países de língua inglesa, “cubiu” na Amazônia ou “maná-cubiu” na região Sudeste do Brasil (Figura 1) (PAHLEN, 1977).

Figura 1. Fruto maná-cubiu. Foto Eliseu Rodrigues

Intensos esforços do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) têm sido direcionados à ampla divulgação e propagação deste fruto ainda pouco explorado comercialmente. O manual técnico proposto por Silva Filho (1998) descreve informações inovadoras como aspectos biológicos, ecológicos, econômicos e agrônômicos deste fruto, buscando informar a população local, bem como a comunidade científica.

O cubiuzeiro é um arbusto herbáceo de 1 a 2 metros de altura, que cresce preferencialmente em regiões de clima quente e úmido (SILVA FILHO, 1998). A produção de frutos inicia-se 7 meses após a sementeira. O tamanho, a forma e o peso dos frutos são muito variáveis. Há relatos de frutos com peso entre 20 a 450 gramas e uma diversidade de formatos como cilíndrico, achatado, redondo ou cordiforme. Quando imaturos, os frutos apresentam-se na cor verde e a fase madura é caracterizada por tons alaranjados (MARX; ANDRADE; MAIA, 1998). A facilidade de cultivo aliada à alta produtividade, a qual pode atingir 100 toneladas de frutos por hectare, tornam o maná-cubiu uma importante matéria-prima para a agroindústria (SILVA FILHO, 1998).

Silva Filho (1998) retrata o sabor do maná-cubiu como sendo muito característico, não podendo ser comparado ao gosto de qualquer outro fruto. O maná-cubiu pode ser consumido na forma *in natura*, sendo preferencialmente processado em sucos, doces e geleias. Seu uso como tempero e molho para pratos à base de frangos e carnes também é bastante apreciado. Os povos indígenas utilizam a polpa do maná-cubiu como cosmético, com intuito de conferir brilho aos cabelos. Na medicina popular, o suco do maná-cubiu é utilizado no controle de concentrações elevadas de colesterol, ácido úrico e glicose no sangue, bem como no tratamento de anemias e queimaduras (SALICK, 1989).

A avaliação da composição química da polpa do maná-cubiu revelou alto teor relativo de água, aproximadamente 90%, e grande variação de macro elementos minerais em relação às diferentes etnovarietades (MARX; ANDRADE; MAIA, 1998). A polpa dos frutos apresentou uma concentração significativa de selênio (0,13 mg/100 g de polpa), sendo que os efeitos benéficos deste micronutriente já foram descritos na literatura, bem como sua ação antioxidante (DOS SANTOS et al., 2007; MARX; ANDRADE; MAIA, 1998). Também foi reportado um conteúdo significativo de fibras alimentares totais na polpa do maná-cubiu (MARX; ANDRADE; MAIA, 1998). Outros estudos evidenciaram a baixa concentração de carboidratos e o baixo valor energético do maná-cubiu (PAHLEN, 1977; YUYAMA et al., 2007). De Andrade e Andrade (2012) verificaram que em relação à outros frutos da família Solanaceae na fase madura, o maná-cubiu é relativamente pobre em macronutrientes como lipídios e proteínas, por outro lado apresenta uma quantidade significativa de metabólitos secundários como carotenoides.

Uma pesquisa com plantas da Colômbia, incluindo o maná-cubiu, revelou que folhas, frutos ou cascas de 19 plantas apresentaram atividade antioxidante (LIZCANO et al., 2010). Um diferencial da polpa do maná-cubiu refere-se à alta quantidade de niacina, uma vitamina do complexo B, que contribui na síntese e reparo do DNA e no sistema imune. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a deficiência de niacina pode conduzir à instabilidade genômica e carcinogênese (HENNING; SWENDSEID; COULSON, 1997; TANG et al., 2008).

Na polpa do fruto do cubiuzeiro também foram identificados compostos fenólicos, carotenoides e vitamina C (LIZCANO et al., 2010; YUYAMA et al., 2007). Rodrigues, Mariutti e Mercadante (2013) realizaram a caracterização dos compostos fenólicos e carotenoides presentes na polpa do maná-cubiu, sendo identificados 17 carotenoides e 5 compostos fenólicos, dos quais β -caroteno, luteína, luteoxantina, violaxantina e ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico) representam os compostos majoritários.

Yuyama et al. (2005) avaliaram a influência do maná-cubiu sobre a concentração sérica de glicose em ratos diabéticos, sendo constatado que o grupo que recebeu a fibra oriunda do maná-cubiu apresentou uma redução significativa da glicose em relação ao grupo controle. É importante ressaltar que ainda não há relatos na literatura de estudos sobre os efeitos da polpa do maná-cubiu no DNA, evidenciando a necessidade de se obter informações biológicas a respeito deste fruto.

1.2 O antitumoral doxorrubicina

Em estudos de toxicologia genética, a utilização de agentes reconhecidamente indutores de danos ao DNA é fundamental e recomendada em diversos protocolos (MACGREGOR et al., 1987; OECD, 1997). A inclusão de um grupo controle positivo mostra-se essencial para validar um ensaio realizado em sistemas modelo *in vitro* ou *in vivo*, bem como evidenciar um efeito protetor de uma determinada substância (KRISHNA; URDA; PAULISSEN, 2000). Dentre as inúmeras substâncias utilizadas como controle positivo, a doxorrubicina tem sido frequentemente empregada em diversos estudos para avaliação de genotoxicidade (PATEL, 2010; SANTOS; TAKAHASHI, 2008), inclusive em trabalhos do nosso grupo de pesquisa (AISSA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2012; AMARAL et al., 2011; ANTUNES; TAKAHASHI, 1998).

A doxorubicina é um antitumoral pertencente à classe das antraciclinas, considerada um dos medicamentos mais utilizados na quimioterapia, apresentando um largo espectro de atividade sobre tumores sólidos, linfomas e leucemias (SWIFT et al., 2006). Apesar de ser um dos mais efetivos agentes antitumorais, o uso clínico da doxorubicina é limitado, devido à sua cardiotoxicidade descrita em diversos estudos clínicos e experimentais (KONOREV; VANAMALA; KALYANARAMAN, 2008; ZHU et al., 2008). Além dos efeitos cardiotóxicos, a doxorubicina ainda pode induzir danos a outros órgãos como fígado, rim e cérebro (AGAPITO et al., 2001; ANANDAKUMAR et al., 2007; BULUCU et al., 2008).

Há mais de 50 anos a doxorubicina vem sendo empregada com sucesso na clínica médica, entretanto os mecanismos responsáveis pela sua ação antineoplásica ainda não foram completamente elucidados. Espera-se ainda que uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na ação da doxorubicina possa permitir o desenvolvimento de novas terapias na prevenção ou o tratamento de seus efeitos adversos, principalmente a cardiomiopatia, sem que haja diminuição da atividade antitumoral desta antraciclina (OCTAVIA et al., 2012; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007).

Dentre os vários mecanismos propostos para a ação antineoplásica da doxorubicina, a inibição da enzima topoisomerase II e a intercalação no DNA parecem ser os mais relevantes (DEAVALL et al., 2012). Antraciclinas interagem com a topoisomerase II, a qual é uma enzima importante na abertura e estabilização do DNA nos processos de replicação e transcrição (SIMUNEK et al., 2009). Já a intercalação no DNA pela doxorubicina pode acarretar na inibição da síntese de RNA e DNA e formação de ligações cruzadas. Além disso, a doxorubicina parece estar envolvida com efeitos diretos na membrana celular e indução de apoptose em resposta à inibição da topoisomerase II (GEWIRTZ, 1999; DEAVALL et al., 2012).

Alguns estudos sugerem que a formação de espécies reativas de oxigênio pela doxorubicina desempenhe um papel crucial no desenvolvimento da cardiotoxicidade (BERTHIAUME; WALLACE, 2007). Um dos alvos mais susceptíveis às espécies reativas de oxigênio são as membranas celulares, conduzindo à peroxidação lipídica (KALENDER; YEL; KALENDER, 2005). Além disso, as espécies reativas de oxigênio podem provocar danos ao DNA, resultando em instabilidade genômica, a qual representa um fator relevante nos processos de mutagênese e carcinogênese (KRYSTON et al., 2011).

A exposição de diferentes linhagens celulares à doxorubicina, assim como tratamentos em camundongos, está associada ao aumento da instabilidade genômica avaliada por meio do teste do micronúcleo (NETO et al., 2011; SERPELONI et al., 2011a) e em ensaios de detecção de aberrações cromossômicas (ANTUNES; TAKAHASHI, 1999b). Estudos em roedores indicaram que a administração de compostos bioativos da dieta, tais como flavonoides e carotenoides inibiram de forma significativa a peroxidação lipídica e a depleção de glutathione (GSH) induzidas pela doxorubicina (TRIVEDI et al., 2011).

Além disso, a doxorubicina tem sido muito utilizada como agente indutor de danos para verificação do efeito protetor de extratos de frutos como “cranberry” (*Vaccinium macrocarpon*), romã (*Punica granatum* L.) e “turkey berry” (*Solanum torvum*) (ELBERRY et al., 2010; FARD et al., 2011; MOHAN et al., 2010). Uma vez evidenciada a indução de danos cromossômicos pela doxorubicina em animais, este antitumoral foi empregado neste estudo como controle positivo na avaliação do potencial antigenotóxico da polpa do maná-cubiu.

1.3 Avaliação de danos ao DNA

A realização de uma série de testes em sistemas modelos *in vitro* ou *in vivo* é recomendada por agências internacionais e instituições governamentais para o registro de novos produtos, que entram no mercado mundial anualmente (CUSTER; SWEDER, 2008). Os resultados obtidos podem ser um indicativo para o desenvolvimento de diversas doenças, dentre elas o câncer, uma vez que estes testes possibilitam a identificação dos estágios de iniciação e promoção da tumorigênese (RIBEIRO, 2003).

Dentre os ensaios recomendados pelas agências regulatórias, o teste do micronúcleo é o mais amplamente utilizado na detecção de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e aneugênicos, que induzem aneuploidia (HAYASHI et al., 2007; HAYASHI; SOFUNI; MORITA, 1991). Desenvolvido por Schmid (1975), o teste do micronúcleo constitui uma importante ferramenta em pesquisas na área de toxicologia genética.

Durante o processo de divisão celular na medula óssea, os eritroblastos sofrem duplicação final dos cromossomos, diferenciando-se em eritrócitos policromáticos (PCE). Estes eritrócitos jovens, caracterizados por uma grande

quantidade de ribossomos, diferenciam-se em eritrócitos normocromáticos (NCE) ou maduros, os quais não contêm ribossomos. Na presença de agentes aneugênicos e/ou clastogênicos, os fragmentos cromossômicos resultantes de cromossomos inteiros ou quebras do material genético podem não ser incorporados no núcleo principal do eritroblasto, o qual será posteriormente expulso das células filhas após a mitose, originando-se assim o micronúcleo (FENECH et al., 1999).

Em ensaios *in vivo*, a análise de micronúcleos é realizada, principalmente, em eritrócitos policromáticos de medula óssea e reticulócitos de sangue periférico (Figura 2) (HAYASHI; SOFUNI; ISHIDATE, 1983). Outros tecidos como fígado, pulmão, baço e intestino também são utilizados no teste do micronúcleo, contudo não há ainda protocolos validados para a maioria destes tecidos (MORITA; MACGREGOR; HAYASHI, 2011).

Figura 2. Fotomicrografias obtidas no teste do micronúcleo em células da medula óssea (A) e do sangue periférico (B) de ratos Wistar. Coloração Giemsa e Laranja de Acridina, respectivamente. Aumento original de 1000X. Fonte: Lívia Cristina Hernandes. Laboratório de Nutrigenômica - FCFRP/USP, 2011. Em (A) e (B), tem-se: (1) Eritrócito policromático (PCE); (2) Eritrócito normocromático (NCE); (3) Eritrócito policromático micronucleado (MNPCE); (4) Reticulócito micronucleado (MNRET)

Além de fornecer informações valiosas sobre danos cromossômicos, o teste do micronúcleo em medula óssea também possibilita a determinação da citotoxicidade de uma substância. Esse efeito é obtido pela relação entre os PCE e os eritrócitos totais (PCE+NCE), da qual se pode inferir a inibição da eritropoiese. Ou seja, a interferência do agente pode impedir o ciclo de maturação dos eritrócitos, resultando em baixa quantidade de PCE. Assim, menores valores dessa relação indicam citotoxicidade, enquanto maiores valores indicam que não houve influência

da substância teste na maturação dos eritrócitos (MACGREGOR et al., 1987).

O teste do micronúcleo tem sido muito empregado na identificação de compostos bioativos da dieta capazes de minimizar a instabilidade cromossômica, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de doenças (THOMAS et al., 2011). Com o intuito de aprimorar os ensaios de genotoxicidade *in vivo* foi discutida no 5º IWGT (*International Workshop on Genotoxicity Testing*) a combinação do teste do micronúcleo e do ensaio do cometa em um mesmo animal, a fim de reduzir o número de animais, bem como a quantidade necessária do composto teste (ROTHFUSS et al., 2011).

A revisão do protocolo S2 para testes de genotoxicidade proposto pela ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) foi fundamentada sob o compromisso de promover a política dos 3Rs (*Reduce, Refine, Replace*) na experimentação animal em estudos pré-clínicos. Dentro desta proposta, a redução de animais pode ser aplicada na combinação de testes de genotoxicidade *in vivo* tanto em ensaios agudos, como em ensaios com doses repetidas. Esta política também pode ser empregada na redução de custos e do tempo necessário para determinação de dados relevantes (BOWEN, et al., 2011; ICH, 2011).

A integração do ensaio do cometa e teste do micronúcleo foi aplicada com sucesso na avaliação de substâncias reconhecidamente genotóxicas por Bowen et al. (2011). Neste projeto foi empregada a associação destes ensaios, uma vez que esta integração representa uma importante aliada na política de redução de tempo, custos e uso de animais.

O ensaio do cometa ou eletroforese de célula única (*Single cell electrophoresis test*), desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) é um ensaio de toxicologia genética amplamente utilizado na avaliação da genotoxicidade de um composto. A versão alcalina do ensaio do cometa foi proposta por Singh et al. (1988) o que possibilitou a otimização da desnaturação do DNA, permitindo uma avaliação de quebras de fita-simples, fita-dupla e sítios álcali-lábeis. Considerado simples e rápido na execução, o ensaio do cometa ainda apresenta como vantagens a necessidade de pequeno número de células, a aplicação em diferentes tecidos, alta sensibilidade e baixo custo (TICE et al., 2000). Enquanto o teste do micronúcleo detecta alterações cromossômicas como quebra ou perda de cromossomos inteiros, o ensaio do cometa detecta alterações primárias no DNA ainda passíveis de serem

eliminadas pelo sistema de reparo. Essas alterações podem ou não ser fixadas no DNA (ROTHFUSS et al., 2011).

Basicamente, o ensaio do cometa envolve a lise de células depositadas em uma lâmina com agarose, levando à formação dos nucleoides, os quais correspondem ao DNA livre de histonas. Quando os nucleoides são submetidos à eletroforese, ocorre migração de DNA danificado em direção ao pólo positivo formando um cometa (Figura 3). Assim, a extensão e a quantidade de DNA na cauda do cometa reflete a intensidade do dano de um composto, sendo que quanto maior a cauda, maior o dano ao material genético (SINGH et al., 1988; SPEIT; HARTMANN, 1995).

Figura 3. Fotomicrografias de nucleoides sem migração de DNA (A) e com migração formando cauda (B) obtidos de células do fígado de ratos Wistar na análise do ensaio cometa em microscópio de fluorescência. Coloração brometo de etídio. Aumento original de 400X. Fonte: Lívia Cristina Hernandes. Laboratório de Nutrigenômica - FCFRP/USP, 2011.

Vários estudos têm aplicado o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo na investigação dos efeitos antigenotóxicos de compostos da dieta, tais como a bixina (DOS SANTOS et al., 2012), clorofila b (SERPELONI et al., 2011b), curcumina (MENDONÇA et al., 2010), quercetina (BARCELOS et al., 2011) e luteína (SERPELONI et al., 2010).

1.4 Biomarcadores de estresse oxidativo

O estresse oxidativo resulta de situações em que a produção de espécies reativas de oxigênio excede a capacidade de defesa antioxidante celular de remover estas espécies químicas (LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Estudos têm

associado o estresse oxidativo à inúmeras condições clínicas como diabetes, aterosclerose e câncer (GIUSTARINI et al., 2009).

A ação de espécies reativas de oxigênio sobre os lipídios de membrana pode conduzir a um processo denominado peroxidação lipídica. Basicamente, a peroxidação lipídica envolve três fases: iniciação, propagação e terminação, sendo que um dos produtos finais é o malondialdeído (MDA), o qual pode formar adutos com o DNA (VALKO et al., 2007). Vários estudos têm identificado uma correlação entre o aumento de MDA e inúmeras doenças como Diabetes Mellitus, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer (DILLIOGLUGIL et al., 2012; REED, 2011; VALKO et al., 2007).

Além do MDA, outros produtos podem ser produzidos ao final do processo de clivagem de lipídios insaturados como o 4-hidroxinonenal e isoprostanos (GIUSTARINI et al., 2009). A peroxidação lipídica é, frequentemente, um dos parâmetros analisados pelos pesquisadores na tentativa de elucidar a relação entre danos celulares e espécies reativas de oxigênio (PALMIERI; SBLENDORIO, 2007).

Entre as metodologias mais confiáveis na determinação da peroxidação lipídica em amostras biológicas estão a cromatografia líquida de alta eficiência e os testes imuno-histoquímicos (PALMIERI; SBLENDORIO, 2007). No entanto, outras técnicas mais simples e acessíveis também são bastante empregadas, como o método proposto para determinação de MDA denominado teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances*). Este ensaio baseia-se na medida espectrofotométrica de uma substância formada pela reação de aldeídos como o MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em altas temperaturas e meio ácido (BUEGE; AUST, 1978).

As defesas antioxidantes são fundamentais para proteger nosso organismo contra a ação das espécies reativas de oxigênio. Um antioxidante pode ser definido como "qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz" (SIES; STAHL, 1995). Esta ação protetora dos antioxidantes se deve a compostos enzimáticos, como as enzimas catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase, e não-enzimáticos, como a glutathione, o ácido ascórbico (vitamina C), o alfa-tocoferol (vitamina E) e o β -caroteno (SIES, 1993).

Os antioxidantes podem proteger o organismo por meio de diferentes mecanismos de ação como pela inibição da formação de radicais livres, através da

interceptação destes compostos gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, e ainda pelo reparo de lesões causadas por radicais livres (ANTUNES; BIANCHI, 1999).

Outro importante biomarcador de estresse oxidativo é a glutathiona, a qual se encontra em todos os órgãos, mas o fígado é o tecido que apresenta as maiores quantidades deste antioxidante (IWASAKI et al., 2009). Por ser um cofator de várias enzimas de desintoxicação como a glutathiona peroxidase e a glutathiona S-transferase, a glutathiona constitui-se uma importante defesa contra o estresse oxidativo (VALKO et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio podem conduzir à oxidação da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG) e a quantificação das concentrações destas diferentes moléculas oferece uma informação relevante sobre o estado redox de um tecido (GIUSTARINI et al., 2009). A diminuição da concentração da GSH e o aumento da GSSH têm sido associados ao desenvolvimento de algumas doenças como insuficiência hepática, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (PASTORE et al., 2003).

Um dos mecanismos apontados na toxicidade da doxorrubicina refere-se à formação de espécies reativas de oxigênio, as quais podem induzir danos ao DNA, proteínas e lipídios (BERTHIAUME; WALLACE, 2007). Nesse sentido, inúmeros estudos têm identificado a ação de compostos da dieta como carotenoides e flavonoides no sequestro de espécies reativas de oxigênio (BOHM; EDGE; TRUSCOTT, 2012). Assim, neste trabalho também foi avaliada a associação da polpa do maná-cubiu e da doxorrubicina na peroxidação lipídica e na depleção de glutathiona em fígado e coração.

1.5 Genes óxido nítrico sintase indutível (*iNos*) e ciclooxygenase-2 (COX-2)

A utilização de ferramentas de biologia molecular, como a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), possibilita a quantificação da expressão de RNA mensageiro (RNAm) de genes induzidos ou inibidos em diferentes tratamentos (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008), permitindo assim avaliar a influência dos compostos bioativos provenientes da dieta no padrão de expressão gênica. Este estudo também visa investigar os efeitos da polpa do maná-cubiu na

quantificação de RNAm de genes envolvidos no processo inflamatório em células do fígado e coração de ratos Wistar.

O gene *Nos 2* (*Nitric oxide synthase 2, inducible*) também conhecido como *iNos*, localiza-se no cromossomo 17 em humanos e no cromossomo 10 em ratos (GENE DATABASE). Este gene codifica a enzima óxido nítrico sintase indutível, a qual catalisa a formação de óxido nítrico (NO) e L-citrulina a partir de L-arginina (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Existem três isoformas desta enzima descritas na literatura: nNOS (óxido nítrico sintase neuronal); eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e iNOS. As duas primeiras isoformas nNOS e eNOS são expressas constitutivamente, principalmente em células neuronais e endoteliais, respectivamente, enquanto que a iNOS não é normalmente expressa nas células, sendo induzida e modulada por citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interferon- γ (IFN- γ), endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo (FUKUMURA; KASHIWAGI; JAIN, 2006; PAUTZ et al., 2010). No entanto, alguns trabalhos têm relatado a expressão do gene *iNos* em certos tecidos sob condições normais como fígado, pulmão, cérebro e estômago (MCNAUGHTON et al., 2002; PARK et al., 2000; PHILLIPSON et al., 2003).

As isoformas nNOS e eNOS produzem pequenas quantidades de NO, as quais podem atuar como neurotransmissores e vasodilatadores (GARTHWAITE, 2008; REES; PALMER; MONCADA, 1989). Por outro lado, a isoforma iNOS participa da formação de grandes quantidades de NO, principalmente em processos inflamatórios. Ao se combinar com ânions superóxido, o NO torna-se o precursor de um potente agente oxidante: o peroxinitrito, o qual tem sido amplamente associado a danos ao DNA, proteínas e lipídios (BENTZ et al., 2012; HALL; WANG; MILLER, 2012).

A inibição da expressão do gene *iNos* tem sido proposta como alvo na prevenção de doenças em que este gene é expresso em demasia como na artrite, síndrome do cólon irritável e no câncer (OHTA; TAKAHASHI; OCHIAI, 2006). Estudos *in vitro* conduzidos com extratos do fruto jamelão (*Eugenia jambolana*) em células de Leydig provenientes de ratos Holtzman identificaram uma redução da expressão dos transcritos do gene *iNos*, bem como da enzima iNOS em relação ao tratamento com peróxido de hidrogênio (ANAND et al., 2012).

Em ratos, o gene *Ptgs2* (*Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*) também conhecido como COX-2 localiza-se no cromossomo 13, enquanto que em humanos

está localizado no cromossomo 1 (GENE DATABASE). A enzima ciclooxigenase-2, codificada pelo gene *COX-2*, é uma das principais enzimas envolvidas no processo inflamatório, atuando na catálise da formação de prostaglandina a partir do ácido araquidônico (CERELLA et al., 2010). Apesar da isoforma da enzima ciclooxigenase-1 (*COX-1*) ser constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, a *COX-2* é induzida em eventos patofisiológicos como na inflamação e na carcinogênese (ROUZER; MARNETT, 2009).

Vários trabalhos na literatura têm associado o aumento da expressão do gene *COX-2* à patogenia do câncer gástrico, colorretal e de mama. Desta forma, pesquisas em torno da modulação da expressão do gene *COX-2* tem ganhado destaque nos últimos anos (RAHMAN et al., 2012; WANG; DUBOIS, 2010). Recentemente, Dai et al. (2012) mostraram que o celocoxibe, um inibidor seletivo da enzima ciclooxigenase-2, inibiu a proliferação celular em linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), bem como preveniu a formação de câncer de mama em ratas Sprague–Dawley, tratadas previamente com o indutor de carcinogênese dimetilbenzatraceno.

Estudos evidenciando a ligação molecular entre a inflamação e o câncer abrem aos pesquisadores novos horizontes na busca por compostos com atividade quimiopreventivas (PHILIP; ROWLEY; SCHREIBER, 2004). A inibição da expressão dos genes *iNos* e *COX-2* por compostos da dieta tem sido proposta como um alvo na prevenção de danos celulares. Prakobwong et al. (2011) observaram que a curcumina, um composto polifenólico, inibiu a expressão das proteínas pró-inflamatórias, a ciclooxigenase-2 (*COX-2*) e a óxido nítrico sintase indutível (*iNOS*), em roedores nos quais foi induzida a carcinogênese pela N-nitrosodimetilamina. Estudos *in vitro* constatarem a inibição da expressão dos genes *COX-2* e *iNOS* em células de glioma C6 pelo resveratrol, um composto polifenólico encontrado em sementes de uva (KIM et al., 2006). O flavonoide quercetina, adicionado à dieta de ratos, resultou em uma diminuição de aproximadamente 24% na expressão do gene *COX-2* em relação à expressão deste gene em animais que receberam uma dieta controle (TURNER et al., 2009).

As características nutricionais aliadas ao fácil cultivo do maná-cubiu representam importantes fatores para a exploração comercial deste fruto pelas indústrias de cosméticos e de alimentos, tais como sucos, geleias e doces. Apesar de alguns trabalhos descreverem aspectos agrônômicos, econômicos e nutricionais

deste fruto, ainda são raros os trabalhos que analisaram a atividade biológica da polpa do maná-cubiu. Assim, considerando o papel importante da dieta sobre a modulação de danos ao DNA torna-se relevante o estudo dos possíveis efeitos biológicos de frutos ainda pouco explorados como o maná-cubiu.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades citotóxicas, genotóxicas, antigenotóxicas, a indução de peroxidação lipídica e as possíveis alterações na transcrição dos genes *iNos* e *COX-2* em ratos tratados com a polpa do maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), associado ou não ao antitumoral doxorrubicina.

2.2. Objetivos específicos

- ⇒ Avaliar a instabilidade genômica em ratos Wistar tratados com a polpa do maná-cubiu, em associação ou não ao antitumoral doxorrubicina, pelo teste do micronúcleo em células da medula óssea e sangue periférico e pelo ensaio do cometa em coração, fígado e sangue;
- ⇒ Verificar se o tratamento com a polpa do maná-cubiu, associado ou não ao antitumoral doxorrubicina, altera a peroxidação lipídica e a concentração de glutatona, em fígado e coração de ratos Wistar;
- ⇒ Investigar possíveis alterações no padrão de transcrição dos genes pró-inflamatórios *iNos* e *COX-2*, em células do fígado e coração de ratos Wistar, nos tratamentos com a polpa do maná-cubiu em associação ou não ao antitumoral doxorrubicina;
- ⇒ Determinar os elementos químicos presentes na polpa liofilizada do maná-cubiu por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Maná-cubiu

Os frutos maduros (7kg) foram adquiridos na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) pela equipe da Prof^a. Dr^a. Adriana Zerlotti Mercadante da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA - UNICAMP). O processo de liofilização do maná-cubiu foi realizado pelo Dr. Eliseu Rodrigues e pela Prof^a. Dr^a. Adriana Zerlotti Mercadante. Os frutos foram lavados, descascados, cortados em pequenos pedaços e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. A liofilização foi realizada por 96 horas a temperatura de -60 °C e pressão < 40 mmHg. A polpa liofilizada foi moída e o pó resultante foi homogeneizado e, então, dividido em frações de 50 gramas em embalagens de polietileno, embalado à vácuo e armazenados a -37 °C até o momento do uso. A composição dos carotenoides e compostos fenólicos presentes na polpa liofilizada do maná-cubiu foi igualmente determinada pelo Dr. Eliseu Rodrigues e pela Prof^a. Dr^a. Adriana Zerlotti Mercadante, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-MS/MS) (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013).

3.2 Fármaco e reagentes

O fármaco doxorrubicina foi utilizado na forma de Cloridrato de Doxorrubicina (Rubidox[®]), adquirido do Laboratório Bergamo (Taboão da Serra, São Paulo, Brasil, número de registro CAS 25136-40-9). A doxorrubicina foi preparada imediatamente antes das administrações, sempre protegida da luz.

Os reagentes para o teste do micronúcleo e ensaio do cometa foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). A coloração de lâminas para o teste do micronúcleo foi realizada com os corante Giemsa (Sigma-Aldrich, CAS 51811-82-6) e Laranja de Acridina (Sigma-Aldrich, CAS 10127-02-3) e para o ensaio do cometa foi utilizado o corante GelREDTM (Biotium, Hayward, California, Estados Unidos, CAS 67-68-5). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.3 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com aproximadamente 110 gramas de massa corpórea, com 4 a 5 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto e mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP em caixas de polietileno com tampa grade, no máximo três animais por caixa, sob condições controladas de temperatura e ciclo alternado de luz/escuro de 12 horas. Os animais receberam ração comercial Nuvilab® CR-1 e água *ad libitum* e foram mantidos segundo os critérios para o cuidado e uso de animais de laboratório.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus USP de Ribeirão Preto, sob o número de Protocolo 11.1.250.53.0 (ANEXO).

3.4 Seleção das doses da polpa do maná-cubiu

Não há informações na literatura sobre a toxicidade da polpa do maná-cubiu, bem como dados sobre a quantidade média consumida desse fruto pelos habitantes da região Amazônica. De acordo com Rothfuss et al. (2011), a seleção de doses na avaliação da genotoxicidade de um composto deve envolver os seguintes critérios: dose máxima viável, baseada nas propriedades físico-químicas do composto; platô de exposição plasmática com aumento da dose ou acumulação do composto em ensaios de dose repetida; e para tratamentos de 14 dias ou mais, a dose limite deve ser 1000 mg/kg/dia.

A partir de testes de solubilidade da polpa liofilizada do maná-cubiu em água, verificou-se que a dose máxima viável foi 500 mg/kg p.c., sendo esta utilizada neste estudo como dose máxima para avaliação dos efeitos do maná-cubiu em ratos Wistar. Também foram selecionadas as doses 125, 250 e 375 mg/kg p.c., referentes respectivamente à 25%, 50% e 75% da dose máxima testada (500 mg/kg p.c.).

Além disso, foi verificado se as doses selecionadas correspondiam a uma quantidade plausível de frutos a ser consumida diariamente por humanos. De acordo com os dados referentes ao rendimento final do processo de liofilização (9%) e massa média dos frutos (152 ± 31 g), constatou-se que para alcançar a maior dose testada (500mg/kg) um adulto de 70 kg deve consumir aproximadamente 2,5 frutos.

Já para as demais doses de 375, 250 e 125 mg/kg, o consumo deve ser de 2, 1,5 e 0,5 frutos, respectivamente.

3.5 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 10 grupos de tratamento (n=6 animais/grupo), a polpa do maná-cubiu foi dispersada em água diariamente e administrada aos animais na forma de gavagem durante 14 dias consecutivos, com intervalos de 24 horas, e a aplicação do agente antitumoral doxorrubicina (16 mg/kg p.c.) ou de solução salina via intraperitoneal (i.p.) foi realizada 24 horas antes da eutanásia, como mostrado na Figura 4. Os grupos de tratamento foram os seguintes:

Grupos Controle:

- Grupo Controle Negativo: os animais receberam água por gavagem e solução salina i.p.;
- Grupo doxorrubicina (DXR): os animais receberam água por gavagem e DXR i.p.;

Grupos Experimentais:

- Grupos MC: os animais receberam a polpa do maná-cubiu nas quatro diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.) por gavagem e solução salina (i.p.);
- Grupos MC + DXR: os animais receberam a polpa do maná-cubiu nas quatro diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.) por gavagem e DXR (i.p.).

Figura 4. Delineamento experimental

Os animais foram pesados diariamente, antes da realização da gavagem, a fim de avaliar possíveis alterações na massa corpórea decorrentes do tratamento. No décimo quinto dia, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% (4 mL/kg p.c., i.p.), o sangue foi coletado da veia caudal para o teste do micronúcleo, seguido de eutanásia por decapitação. Fígado e coração dos animais foram coletados e pesados para estabelecer a relação entre massa do órgão/massa corpórea. Amostras destes órgãos foram coletadas para o ensaio do cometa e também foram armazenadas em criotubos, sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e colocadas em ultrafreezer (-80°C) para análises posteriores de dosagem de glutathiona tecidual, peroxidação lipídica e transcrição gênica. Além disso, foram removidos os fêmures dos animais para a análise citogenética da presença de micronúcleos em eritrócitos policromáticos.

3.6 Teste do micronúcleo em células da medula óssea

O teste do micronúcleo foi realizado segundo protocolo descrito por Schmid (1975). As células da medula óssea foram coletadas dos fêmures dos animais com 2

mL de soro bovino fetal com auxílio de uma seringa. O material foi colocado dentro de um tubo de centrífuga e homogeneizado com auxílio de pipeta Pasteur. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos a 110,91 g e uma parte do sobrenadante foi descartada. O *pellet* foi ressuspensionado em aproximadamente 0,5 mL de soro bovino fetal e foram feitos esfregaços em lâminas previamente limpas. Após 24 horas, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos.

Para coloração das lâminas, utilizou-se Giemsa diluído em tampão fosfato (0,06M Na₂HPO₄ e 0,06M KH₂PO₄, pH 6,8), na proporção de 1mL de corante para 20 mL da solução tampão por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada e secas à temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Zeiss, modelo Primostar®), em aumento de 1000x, com objetiva de imersão. Dois mil eritrócitos policromáticos (PCE) foram analisados para cada animal, verificando-se a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MNPCE). A identificação dos micronúcleos foi realizada de acordo com Huber, Streng e Bauchinger (1983) e Titenko-Holland et al. (1997), como descrito a seguir:

- Micronúcleos devem ter forma arredondada e contorno liso e definido;
- Micronúcleos devem ter 1/10 a 1/20 do tamanho do PCE;
- Micronúcleos não podem ser refringentes.

A porcentagem de redução na frequência de células micronucleadas para os tratamentos com a polpa do maná-cubiu associado à doxorrubicina foi calculada de acordo com Manoharan, Banerjee (1985) e Waters et al. (1990) usando a fórmula:

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

Onde A é o grupo doxorrubicina (controle positivo), B é o grupo referente à associação da polpa do maná-cubiu e doxorrubicina e C é o grupo controle negativo.

Além da análise de incidência de micronúcleos, foi realizada a relação entre o número de PCE no total de 500 eritrócitos (PCE+NCE) por animal. A coloração de lâminas com Giemsa possibilita a distinção de células da medula óssea devido às diferentes fases de maturação em que estas se encontram, sendo que os eritrócitos jovens (PCE) se coram de azul ou roxo e eritrócitos maduros (NCE) apresentam uma coloração rósea (HEDDLE et al., 2011).

3.7 Teste do micronúcleo em sangue periférico

O teste do micronúcleo em sangue periférico foi realizado como descrito por Hayashi et al. (1990). Primeiramente, foi feito um esfregaço com o sangue periférico obtido da veia caudal dos animais no 15º dia. Após 24 horas, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos, secas em temperatura ambiente e coradas com Laranja de Acridina (1,8 µg/mL) por 3 minutos imediatamente antes da análise.

Foram analisados 1000 reticulócitos, e anotadas as frequências de células micronucleadas, em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Axiostar Plus) usando luz azul 488 nm e filtro amarelo, com aumento de 400x. A porcentagem de redução (%R) na frequência de células micronucleadas do sangue periférico para os tratamentos com a polpa do maná-cubiu associado à doxorrubicina foi calculado como descrito no item 3.6.

3.8 Ensaio do cometa em coração, fígado e sangue periférico

O ensaio do cometa foi realizado segundo a metodologia de Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000). A partir das amostras de fígado e coração coletadas (0,4 g), obteve-se suspensões celulares por meio de separação mecânica, com auxílio de tesouras, empregando 1 mL de solução de Hanks. Determinou-se, em seguida, a viabilidade celular no homogenato de ambos os órgãos pelo método de exclusão do azul de tripan 0,4%. Posteriormente, as suspensões celulares do fígado e coração (80 µL) foram misturadas com agarose de baixo ponto de fusão (240 µL), transferindo-se uma alíquota desta mistura (80 µL) sobre lâminas microscópicas previamente revestidas com agarose normal (1,5%). O sangue periférico coletado da veia caudal (25 µL) foi homogeneizado com 270 µL de agarose de baixo ponto de fusão, sendo distribuídos 80 µL desta solução sobre as lâminas microscópicas revestidas com agarose normal. Lamínulas foram colocadas sobre as lâminas e mantidas a 4°C por 20 minutos. As lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10% DMSO, 1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 10) por 22 horas a 4°C.

Decorrido o tempo de lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de vidro vertical contendo solução de eletroforese (300 mM NaOH , 1 mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para permitir a desnaturação do DNA. Em seguida, as

lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese contendo solução de eletroforese e submetidas a um campo elétrico de intensidade 0,78 V/cm (25 V e 300 mA) por 20 minutos. Após esse período, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 5 minutos. Depois de secarem a temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 2 minutos e armazenadas até o momento da análise.

Antes da análise, as lâminas foram coradas com o agente intercalante de DNA GelRED™ (0,1 µg/mL) por 3 minutos. Foram analisadas 100 imagens de nucleoides para cada animal de forma aleatória com o auxílio do microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Axiostar Plus) utilizando filtro 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm, com aumento original 400x. Os cometas foram avaliados por meio do software de análise de imagem CometAssay IV, versão 4.3 (Perceptive Instruments Ltd.), sendo analisado o parâmetro *Tail intensity*, referente à porcentagem de DNA na cauda (% DNA). A porcentagem de redução no ensaio do cometa para os tratamentos com a polpa do maná-cubiu associado à doxorrubicina foi calculado como descrito no item 3.6.

3.9 Análise das concentrações de TBARS e GSH no fígado e coração de ratos

As concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido hepático e cardíaco de ratos foram determinadas pelo método descrito por Buege e Aust (1978). Alíquotas de 0,2 g de fígado ou coração foram homogeneizadas com 2 mL de KCl 1,15%. Em seguida, 0,5 mL do homogenato foi misturado com 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) + ácido tricloracético (TCA) (TBA 3,7 g/L + TCA 50% em HCl 0,25 mol/L). A mistura foi mantida por 15 minutos em banho fervente e após resfriamento as amostras foram submetidas à centrifugação a 2120 g por 15 minutos. A absorbância do sobrenadante foi medida em 535 nm e a curva padrão foi feita usando 1,1,3,3 tetramethoxypropano (Sigma-Aldrich, CAS 102-52-3). A concentração de TBARS nos tecidos foi expressa em nmol/g de proteína.

A dosagem de glutathiona foi baseada no método descrito por Sedlak e Lindsay (1968), sendo realizada no fígado e coração dos animais. Inicialmente, 0,6 mL do homogenato obtido do processo descrito acima foi diluído em 1,4 mL de água

e precipitado com 0,1mL de TCA 50%. Em seguida, as amostras foram agitadas por 1 minuto e centrifugadas a 1222 g por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada à 2,0 mL de tampão Tris-EDTA (0,2 M, pH 8,9) e 0,1 mL de DTNB [5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)]. Após agitadas em vórtex, as amostras foram mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, a absorbância foi medida em 412 nm usando curva padrão de α -cisteína. Os resultados foram expressos em nmol GSH/mg de proteína. O método de Hartree foi utilizado para determinação das concentrações de proteína no tecido hepático e cardíaco (HARTREE, 1972).

3.10 Análise da expressão de RNAm dos genes *iNos* e *COX-2* em coração e fígado de ratos

Amostras de fígado e coração foram coletadas, após a eutanásia em criotubos contendo RNAlater™ (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) e armazenadas em freezer (-80° C) até o momento do uso. Os grupos submetidos à análise por RT-qPCR foram controle negativo, controle positivo, grupo maná-cubiu 375 mg/kg p.c., e grupo maná-cubiu 375 mg/kg p.c. associado à doxorrubicina. Cabe ressaltar que apenas a dose 375 mg/kg p.c. foi selecionada uma vez que os animais tratados com esta dose apresentaram maiores reduções de danos ao DNA em relação às demais doses testadas.

3.10.1 Extração de RNA

A extração do RNA foi realizada com Trizol LS® (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos, CAS 10296-010) de acordo com as instruções do fabricante, seguido de purificação por meio de mini-colunas com o kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Antes de ser convertido em cDNA, o RNA extraído foi submetido a um tratamento com DNase I® (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) para eliminação de qualquer DNA genômico remanescente presente nas amostras.

3.10.2. Avaliação quantitativa e qualitativa do RNA total

A determinação da concentração e da pureza do RNA total das amostras foi realizada por meio de leitura espectrofotométrica (NanoDrop 200c, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

A integridade do RNA extraído foi determinada por meio de gel de agarose (1%), sendo que a agarose (50 g) foi fundida em 50 mL de tampão TAE (Tris-acetato 40mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,0) e adicionado 5 µL de corante GelRED™ (Biotium, Hayward, California, Estados Unidos, CAS 67-68-5). As amostras de RNA (1µg/poço) acrescidas de *dye loading solution* (30% glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol) foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese por 90 minutos (80 V, 30 mA). Em seguida, o gel foi fotografado em fotodocumentador UV (Molecular Imager® GelDoc™ XR, Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

3.10.3 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por meio do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem, Foster, Estados Unidos), seguindo as orientações do fabricante.

3.10.4 Primers

Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa *Primer-Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e *Primer Quest* (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) e testados *in silico* por meio dos programas *OligoAnalyzer* 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) e *GeneRunner* (<http://www.generunner.net/>) com o objetivo de verificar uma possível formação de dímeros, heterodímeros e grampos. Além disso, foi verificado a especificidade de cada par de *primer* por meio da curva de dissociação, em que o pico único de amplificação indica a especificidade dos *primers* (Figura 5).

Figura 5. Curvas de dissociação dos genes *Rps29*, *Actb*, *COX-2* e *iNos* com apenas um pico de amplificação, mostrando a especificidade dos *primers*

Na Tabela 1 estão apresentadas as sequências dos *primers* e o tamanho de cada fragmento amplificado (*amplicon*). A síntese dos *primers* foi realizada pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

Tabela 1- *Primers* utilizados nas reações de RT-qPCR e o tamanho dos fragmentos amplificados (*amplicon*)

Gene	Sequência (5'-3')	<i>Amplicon</i> (pb)
<i>iNos forward</i>	CAGAGTGAGAAGTCCAGCC	155
<i>iNos reverse</i>	GAACAATCCACAACCTCGCTC	
<i>COX-2 forward</i>	ATCAGGTCATCGGTGGAG	122
<i>COX-2 reverse</i>	GCACCAGACCAAAGACTTC	
<i>Rps29 forward</i>	CTTCATTAAGTTGGACTAAGCG	99
<i>Rps29 reverse</i>	GCAAAGACTAGCATGATTGGT	
<i>Actb forward</i>	TGATGGTGGGTATGGGTGTCAG	104
<i>Actb reverse</i>	GGTGACAATGCCATGTTCAAT	

Neste estudo, foram testados 4 genes de referência: beta-actina (*Actb*), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*Gapdh*), hipoxantina1 fosforibosiltransferase (*Hprt1*) e proteína ribossomal S29 (*Rps29*). Os genes *Actb* e *Rps29* apresentaram menores variações independentemente dos grupos experimentais e desta forma foram selecionados para normalização dos dados obtidos na RT-qPCR.

3.10.5 RT-qPCR

No sistema SYBR[®]Green, o corante pode se ligar à sequências não específicas de DNA dupla-fita, possibilitando desta forma a geração de sinais falso-positivos (APPLIED BIOSYSTEM, 2004). Apesar do *primer* desenhado para o gene *iNos* ter sido extensivamente testado em programas que verificam a formação de estruturas secundárias, a eficiência da amplificação do *primer* não atingiu a faixa recomendada de 90% a 110%, como descrito no item 3.10.6, comprometendo desta forma os resultados obtidos para a expressão relativa do RNAm do gene *iNos*. Portanto, neste trabalho, apenas os resultados referentes ao gene *COX-2* estão apresentados.

O ensaio de RT-qPCR foi realizado em termociclador CFX96 (BioRad, Hercules, Estados Unidos) no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, coordenado pelo Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa. O kit Platinum[®] SYBR[®] Green (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) foi empregado para amplificação do cDNA e as reações apresentaram volume final de 13 µL por poço, dos quais 7 µL de Platinum[®] SYBR[®] Green, 5 µL de amostra diluída de cDNA (100ng de cDNA/poço), 0,5 µL de *primer Reverse* e 0,5 µL de *primer Forward* na concentração final de 0,38 µmol/L de cada *primer*.

A amplificação foi realizada nos seguintes passos: 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.

3.10.6 Eficiência da amplificação

Diluições seriadas de cDNA (razão 1:10) foram submetidas à reação de RT-qPCR nas mesmas condições descritas no item anterior, com o objetivo de determinar a eficiência da amplificação (E) de cada *primer*. Os *primers COX-2*, *Actb* e *Rps29* apresentaram eficiência entre 90% e 110%, enquanto que o *primer* do gene *iNos* apresentou uma eficiência de amplificação de 183%.

3.11 Determinação dos elementos químicos presentes na polpa do maná-cubiu

Em parceria com o Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) foi realizada a determinação de 50 elementos químicos presentes na polpa liofilizada do maná-cubiu por meio de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), pelo Dr. Bruno Lemos Batista e pela Ms. Eloísa Silva de Paula.

A digestão da polpa liofilizada do maná-cubiu foi realizada em vasos fechados assistida por microondas (Milestone START D). A amostra (aproximadamente 100 mg) foi pesada em tubos de digestão de Teflon®, sendo adicionados 4 mL de ácido nítrico (14 mol/L) e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). Em seguida, a amostra foi colocada em forno de microondas e a decomposição foi realizada de acordo com os seguintes passos:

1. Aquecimento a 160°C por 4,5 minutos e potência de 1000 W;
2. Aquecimento a 160°C por 0,5 minutos e potência de 0 W;
3. Aquecimento a 230°C por 5 minutos e potência de 1000 W;
4. Aquecimento a 230°C por 15 minutos e potência de 1000 W;
5. Resfriamento a 0°C por 20 minutos e potência de 0 W.

Posteriormente, a amostra digerida foi resfriada, sendo adicionada água de alta pureza para completar um volume final de 50 mL. Adicionou-se, ainda, Ródio como padrão interno na concentração final de 10 µg/L. Em seguida, 50 elementos químicos foram determinados por ICP-MS (Elan DRC II PerkinElmer®, Norwalk, Connecticut, Estados Unidos). Os resultados estão expressos em mg/ 100g de polpa liofilizada.

3.12 Análise Estatística

Os resultados apresentados neste trabalho estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste K-S (Teste Kolmogorov-Smirnov) e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett com auxílio do programa GraphPad Prism 5. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os parâmetros

avaliados.

Para os testes de genotoxicidade e mutagenicidade, os grupos tratados com a polpa do maná-cubiu foram comparados com o controle negativo. Para os testes de antigenotoxicidade e antimutagenicidade os grupos tratados com a polpa do maná-cubiu associada à doxorubicina foram comparados com o grupo controle positivo (DXR).

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Variação de massa corpórea e massa relativa do coração e fígado

Os primeiros parâmetros avaliados neste estudo foram o ganho de massa corpórea, referente à diferença entre a massa corpórea final e inicial dos animais, e as relações entre a massa do fígado/massa corpórea e a massa do coração/massa corpórea. Os resultados da variação de massa corpórea dos animais tratados com as quatro doses da polpa de maná-cubiu (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.) associadas ou não ao antitumoral doxorubicina estão apresentados na Figura 6. Os dados obtidos a partir da variação de massa corpórea indicaram que não houve diferença significativa entre os diferentes grupos experimentais ($p > 0,05$).

Figura 6. Variação da massa corpórea (diferença entre a massa corpórea final e a inicial) de ratos Wistar tratados com diferentes doses da polpa de maná-cubiu (MC 125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.) associada ou não à doxorubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.). Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo (6 animais/grupo). CN: Controle negativo. Não houve diferença estatística entre os grupos, ANOVA e teste de Dunnett ($p > 0,05$)

Em estudos de avaliação toxicológica, variações de massa corpórea e relações entre massa de órgãos/massa corpórea nos grupos tratados e não tratados são bastante empregadas com objetivo de predizer efeitos tóxicos do composto teste e identificar possíveis órgãos-alvo mais afetados pela exposição (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010; WOLFSEGGGER et al., 2009).

Outros frutos da mesma família do maná-cubiu também não apresentaram efeitos sobre a massa corpórea de ratos. A administração oral do extrato do fruto *Solanum indicum* ssp. *distichum* na dose de 1000 mg/kg p.c. a ratos Wistar, por um período de 4 semanas a 6 meses, não alterou o ganho de massa corpórea de machos ou fêmeas em relação ao grupo controle negativo (ABDEL-AZIZ et al., 2011). Um estudo conduzido com ratos Wistar tratados com 250mg/kg p.c do extrato do fruto *Solanum nigrum* também não identificou alterações significativas na massa corpórea dos animais ao final de 30 dias de tratamento (ARULMOZHI et al., 2010).

A administração intravenosa de doxorubicina (10 mg/kg p.c.) a ratos Sprague-Dawley reduziu significativamente a massa corpórea após três dias da aplicação deste antitumoral (XIN et al., 2011). Uma redução significativa na massa corpórea e na massa relativa do coração foi também identificada em ratos Sprague-Dawley tratados com doxorubicina (15mg/kg p.c.) e eutanasiados após 5 dias da aplicação intraperitoneal do fármaco (ALIMORADI et al., 2012). Neste trabalho, não foi observado um decréscimo significativo na massa corpórea de animais que receberam doxorubicina, provavelmente, em decorrência ao menor tempo de exposição ao antitumoral (24 horas) em comparação aos outros estudos.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos da relação entre a massa do fígado/massa corpórea e a massa do coração/ massa corpórea dos ratos dos diferentes grupos experimentais, e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados ($p>0,05$).

Tabela 2- Relação, em porcentagem, entre massa do fígado/ massa corpórea e massa coração/ massa corpórea de ratos Wistar tratados com diferentes doses da polpa de maná-cubiu (MC 125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.) associada ou não à doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.)

Grupos	Relação massa fígado/ massa corpórea final (%)	Relação massa coração/ massa corpórea final (%)
CN	4,39 ± 0,34	0,45 ± 0,05
MC125	4,53 ± 0,32	0,43 ± 0,03
MC 250	4,60 ± 0,37	0,46 ± 0,04
MC 375	4,32 ± 0,23	0,50 ± 0,06
MC 500	4,49 ± 0,22	0,45 ± 0,05
DXR	4,85 ± 0,56	0,42 ± 0,05
MC 125+DXR	4,89 ± 0,35	0,44 ± 0,03
MC 250+DXR	4,92 ± 0,88	0,47 ± 0,04
MC 375+DXR	4,69 ± 0,30	0,41 ± 0,05
MC 500+DXR	4,45 ± 0,34	0,50 ± 0,05

Valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo (6 animais/grupo). CN: Controle negativo. Não houve diferença estatística entre os grupos, ANOVA e teste de Dunnett ($p>0,05$)

Alterações nos valores relativos da massa do fígado ou do coração poderiam indicar hipertrofia/atrofia hepatocelular ou cardíaca, decorrente de um determinado tratamento. Soares-Mota et al. (2010) avaliaram os efeitos da adição de 10% do fruto lobeira (*Solanum lycocarpum* A. St. Hill) na dieta de ratos Wistar durante 8 semanas e identificaram uma redução no ganho de massa corpórea, tanto em machos como em fêmeas. Nesse mesmo estudo, foi verificada uma redução na massa relativa do coração das fêmeas, bem como alterações bioquímicas séricas, sendo sugerida uma leve cardiotoxicidade decorrente da administração do fruto.

Na avaliação toxicológica do extrato hidroalcoólico do fruto *Solanum cernuum* Vell, fruto da mesma família do maná-cubiu, não foram identificadas diferenças significativas na massa corpórea e na massa relativa do fígado de camundongos tratados com as doses 100 mg ou 1400 mg/kg p.c. do extrato em um tratamento subcrônico (ALMANCA et al., 2011). Da mesma forma, os resultados do presente estudo indicaram que a administração subaguda da polpa do maná-cubiu nas doses 125, 250, 375 e 500 mg/kg p.c., associada ou não à doxorrubicina não alterou os parâmetros de massa corpórea e massa relativa do coração e fígado.

Recentemente, foi ressaltada, no editorial da Revista *Food and Chemical Toxicology*, a importância da caracterização adequada dos compostos presentes em

plantas para publicação em revistas científicas indexadas. Na pesquisa científica recomenda-se que os experimentos sejam descritos em detalhes suficientes para que possam ser independentemente reproduzidos. Nestes detalhes, o editorial destaca a identificação e a quantificação dos constituintes bioativos presentes em extratos e polpas, os quais podem estar associados a um determinado efeito biológico (KNASMUELLER, et al., 2012).

Neste estudo, a caracterização dos compostos bioativos presentes na polpa do maná-cubiu foi realizada na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA - UNICAMP) pelo Dr. Eliseu Rodrigues. Os dados referentes à caracterização dos compostos bioativos majoritários da polpa liofilizada são importantes para interpretação dos resultados obtidos nesta pesquisa e já foram publicados recentemente na revista científica *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013).

Na polpa do maná-cubiu foram identificados 17 carotenoides e 5 compostos fenólicos. Os carotenoides majoritários foram all-trans- β -caroteno (7,15 $\mu\text{g/g}$ de polpa), all-trans-luteína (2,41 $\mu\text{g/g}$ de polpa), 9 cis-luteoxantina (1,33 $\mu\text{g/g}$ de polpa), all-trans-luteoxantina (1,30 $\mu\text{g/g}$ de polpa) e all-trans-violaxantina (0,98 $\mu\text{g/g}$ de polpa), e entre os compostos fenólicos, o ácido 5-cafeoilquínico (1298 $\mu\text{g/g}$ de polpa) e duas espermidina bis e tris dihidrocafeoil (199 $\mu\text{g/g}$ e 158 $\mu\text{g/g}$ de polpa, respectivamente) representam os compostos mais abundantes. Em relação a outros frutos Amazônicos como pupunha, tucumã e buriti, a polpa do maná-cubiu apresentou uma baixa quantidade de carotenoides (16,1 $\mu\text{g/g}$ de polpa), enquanto que o extrato fenólico apresentou uma quantidade mais expressiva (1816 $\mu\text{g/g}$ de polpa) (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013).

Além disso, Rodrigues, Mariutti e Mercadante (2013) avaliaram a capacidade antioxidante do extrato do maná-cubiu frente ao peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e à radicais peroxila. O extrato rico em carotenoides da polpa do maná-cubiu demonstrou uma potente ação desativadora de radicais peroxila, enquanto que o extrato rico em compostos fenólicos apresentou uma grande eficiência em desativar peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Ainda, o extrato rico em carotenoides do maná-cubiu demonstrou uma maior capacidade em desativar radicais peroxila em relação aos padrões licopeno, β -caroteno e luteína, sendo proposta a ocorrência de sinergismo entre os carotenoides presentes no maná-

cubiu. A maior eficiência na desativação de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso apresentada pelo extrato fenólico em relação ao padrão do ácido 5-cafeoilquínico sugere que outros compostos presentes no extrato, incluindo as poliaminas, estejam envolvidos na potente capacidade de desativar espécies reativas.

4.2 Teste do micronúcleo

4.2.1 Avaliação da citotoxicidade da polpa do maná-cubiu

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamentos ($p > 0,05$), indicando que a polpa do maná-cubiu nas doses 125, 250, 375 e 500 mg/kg p.c. não foi citotóxica. Além disso, os animais tratados com doxorrubicina não apresentaram uma redução na relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos totais em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos totais (PCE+NCE) na medula óssea de ratos Wistar tratados com a polpa de maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.)

Grupos	PCE/PCE + NCE
CN	0,51 ± 0,06
MC 125	0,50 ± 0,04
MC 250	0,53 ± 0,06
MC 375	0,53 ± 0,06
MC 500	0,47 ± 0,10
DXR	0,43 ± 0,03
MC 125 + DXR	0,48 ± 0,04
MC 250 + DXR	0,46 ± 0,06
MC 375 + DXR	0,46 ± 0,08
MC 500 + DXR	0,47 ± 0,03

Valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo (6 animais/grupo). CN: Controle negativo. Não houve diferença estatística entre os grupos, ANOVA e teste de Dunnett ($p > 0,05$)

A determinação da citotoxicidade de compostos na medula óssea por meio da relação entre PCE e o total de eritrócitos é um parâmetro bastante empregado em avaliações toxicológicas, inclusive ainda em investigações utilizando compostos

isolados da dieta e extratos de frutos (BERNI et al., 2012; NERI-NUMA et al., 2013). Uma redução significativa neste parâmetro pode indicar toxicidade decorrente da inibição do ciclo de maturação dos eritrócitos (MACGREGOR et al., 1987).

Os resultados do presente estudo mostram a ausência de citotoxicidade do maná-cubiu, e outras pesquisas com extratos de frutos da mesma família do maná-cubiu também não identificaram citotoxicidade. Extratos aquosos de berinjela (*Solanum melongena*) nas doses 0,75, 1,5 e 2,4 g/kg p.c. foram administradas por via oral, durante cinco dias consecutivos em ratos Wistar e não foram observados efeitos citotóxicos na medula óssea (CHACON et al., 2002). A administração de extrato hidroalcoólico do fruto *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. nas doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg p.c. em camundongos também não interferiu na porcentagem de PCE em relação ao número total de eritrócitos na medula óssea (TAVARES et al., 2011). Avaliações toxicológicas de extratos das plantas *Solanum cernuum* Vell., *Solanum fastigiatum* e *Solanum xanthocarpum* não apresentaram toxicidade em animais (ALMANCA et al., 2011; GUPTA et al., 2011; SABIR; ROCHA, 2008).

Entretanto, já foi demonstrado que diversas plantas da família Solanaceae são conhecidas por sintetizar metabólitos secundários conhecidos como alcaloides esteroidais, com a finalidade de protegê-las contra a ação de fitopatógenos (SIMÕES et al., 2004). Estudos relatam os efeitos tóxicos de alguns alcaloides presentes nestas plantas, os quais estão associados à danos na membrana plasmática e à inibição da enzima acetilcolinesterase (RODDICK, 1989; VAN DER MOST et al., 2006). Yen; Chen; Peng (2001) identificaram atividade citotóxica do extrato do fruto imaturo de *Solanum nigrum* L. pelo teste de Ames. A adição de 10% do fruto imaturo *Solanum lycocarpum* na dieta de ratas prenhas ocasionou efeitos neurotóxicos e comportamentais na prole (SCHWARZ et al., 2005).

Não há estudos sobre a composição de alcaloides esteroidais na espécie *Solanum sessiliflorum* Dunal. Porém, os resultados obtidos neste estudo demonstraram a ausência de citotoxicidade avaliada pela relação entre PCE e eritrócitos totais, assim como não foram identificadas alterações significativas na massa corpórea e dos órgãos fígado e coração dos animais tratados com a polpa do maná-cubiu.

4.2.2 Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade da polpa de maná-cubiu em células da medula óssea e sangue periférico

Os resultados obtidos no teste do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico indicaram que o tratamento com a polpa do maná-cubiu nas doses de 125, 250, 375 e 500 mg/kg p.c. não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) na frequência de micronúcleos, quando comparado com o grupo controle negativo (Tabela 4). Estes resultados demonstram que a polpa do maná-cubiu não foi mutagênica nas condições empregadas neste estudo. Vieira et al. (2010) mostraram que extratos do fruto da jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) nas doses 100 e 300 mg/kg p.c. também não exibiram ação mutagênica em células da medula óssea de camundongos submetidos a tratamento agudo pelo teste do micronúcleo.

No grupo tratado com o antitumoral doxorrubicina foi observada uma elevação significativa na frequência de micronúcleos em células da medula óssea e do sangue periférico em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). A indução de danos cromossômicos pela doxorrubicina em células da medula óssea e sangue periférico já foi descrita em diversos trabalhos relatados na literatura, inclusive do nosso grupo de pesquisa (ANTUNES; TAKAHASHI, 1999a; RIBEIRO et al., 2010; TAKEUCHI; ANTUNES; TAKAHASHI, 2008). A dose de doxorrubicina selecionada neste estudo (16mg/kg p.c.) foi baseada em outros trabalhos em que esta dose foi capaz de induzir danos cromossômicos em ratos Wistar (AISSA et al., 2012; FERREIRA et al., 2007).

A administração da polpa do maná-cubiu, nas doses 250 e 375 mg/kg p.c., associada à doxorrubicina reduziu significativamente a frequência de micronúcleos no sangue periférico ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo doxorrubicina. Em células da medula óssea, os grupos tratados com doxorrubicina e maná-cubiu na dose 375 mg/kg p.c. exibiram uma redução significativa na frequência de micronúcleos em relação ao grupo controle positivo ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea e reticulócitos micronucleados (MNRET) no sangue periférico de ratos Wistar tratados com a polpa do maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.)

Grupos	Medula óssea		Sangue periférico	
	MNPCE/1000PCE	% Redução	MNRET/1000RET	% Redução
CN	1,58 ± 0,58	-	1,83 ± 1,17	-
MC 125	1,75 ± 0,94	-	3,83 ± 2,14	-
MC 250	1,50 ± 1,05	-	2,17 ± 1,47	-
MC 375	2,17 ± 1,03	-	2,67 ± 1,03	-
MC 500	1,75 ± 1,37	-	2,17 ± 1,83	-
DXR	16,92 ± 5,31 ^a	-	12,33 ± 4,13 ^a	-
MC 125 + DXR	11,42 ± 5,75 ^a	35,86	6,67 ± 3,45 ^a	53,95
MC 250 + DXR	9,67 ± 3,66 ^a	47,29	6,50 ± 4,68 ^{a,b}	55,54
MC 375 + DXR	6,08 ± 5,35 ^b	70,66	5,00 ± 3,23 ^{a,b}	69,83
MC 500 + DXR	11,50 ± 5,65 ^a	35,33	9,83 ± 5,77 ^a	23,81

Valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo (6 animais/grupo). Foram analisadas 2000 células na medula óssea e 1000 células no sangue periférico para cada animal. ^a Estatisticamente diferente do grupo CN (Controle negativo); ^b Estatisticamente diferente do grupo DXR, ANOVA e teste de Dunnett (p < 0,05)

No protocolo estabelecido por Macgregor et al. (1987), um aspecto importante no teste do micronúcleo é a escolha da via de administração da substância teste. Neste estudo, a administração da polpa de maná-cubiu nos animais foi realizada por via oral, com o objetivo de mimetizar a rota de exposição humana ao maná-cubiu. Em relação à doxorrubicina, a via de administração selecionada foi a intraperitoneal, uma vez que trabalhos na literatura já indicaram que esta via possibilita a indução de danos cromossômicos (PRAHALATHAN et al., 2006).

O grande interesse pela identificação de alimentos ou compostos isolados com ação antimutagênica é reflexo dos inúmeros trabalhos disponíveis na literatura com expressivo destaque para extratos e polpas de frutos (BOWEN et al., 2011). Um estudo recente conduzido por Almeida et al. (2012) identificou uma redução significativa de danos ao DNA de células da medula óssea de ratos Wistar tratados com a polpa do fruto piquiá (*Caryocar villosum*) nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg p.c. em associação com o antitumoral doxorrubicina (15 mg/kg p.c.). Ribeiro et al. (2010) avaliaram os efeitos da administração da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) em camundongos Swiss submetidos a tratamentos subagudos e agudos. Os resultados do teste do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico

evidenciaram o efeito protetor da polpa do açaí sobre a instabilidade cromossômica induzida pelo antitumoral doxorrubicina.

Outros estudos empregando extratos de frutos também identificaram a ação antimutagênica em ensaios *in vivo* ou *in vitro* por meio do teste do micronúcleo, como o abacate (*Persea americana* Mill.), melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) e morango (*Fragaria vesca*) (AGRAWAL; BEOHAR, 2010; PAUL; KULKARNI; GANESH, 2011; SMITH et al., 2004). Além destes, pesquisas com frutos do mesmo gênero do maná-cubiu demonstraram efeitos protetores sobre o DNA. Um estudo com extrato hidroalcoólico do fruto lobeira (*Solanum lycocarpum* A. St. Hill.) nas doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg p.c. apresentou ação antimutagênica em células da medula óssea de camundongos frente aos danos induzidos pelo antitumoral doxorrubicina pelo teste do micronúcleo (TAVARES et al., 2011).

Células micronucleadas formadas na medula óssea pela ação de agentes mutagênicos podem também ser detectadas no sangue periférico de ratos adultos, no entanto alguns trabalhos advertem que a remoção destas células pelo baço de ratos pode afetar a sensibilidade do teste do micronúcleo (ABRAMSSON-ZETTERBERG; GRAWE; ZETTERBERG, 1999). Vários estudos evidenciam as vantagens da realização do teste do micronúcleo de sangue periférico em relação à medula óssea como a utilização de pequena quantidade de amostra, facilidade de contagem e a possibilidade de avaliação em diferentes intervalos de tempo utilizando o mesmo animal (MAVOURNIN et al., 1990).

Além disso, o teste do micronúcleo em sangue periférico tem sido recomendado pelos principais protocolos estabelecidos para avaliação de danos agudos e cumulativos ao DNA (ICH, 2011; OECD, 1997). Ainda, Bonassi et al. (2007) evidenciaram a utilização do teste do micronúcleo em linfócitos do sangue periférico como biomarcador de risco de câncer, sugerindo que o aumento na formação de micronúcleos está associado às etapas iniciais da carcinogênese. Deste modo, o teste do micronúcleo em sangue periférico representa uma ferramenta importante na investigação do potencial mutagênico de diferentes compostos.

A doxorrubicina é um dos antitumorais mais efetivos no tratamento de tumores sólidos, leucemias, linfomas e câncer de mama. No entanto, calcula-se que aproximadamente 10% dos pacientes tratados com doxorrubicina desenvolvem

sérias complicações cardíacas (OCTAVIA et al., 2012). Alguns dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos antitumorais e tóxicos da doxorubicina incluem intercalação em DNA nuclear e mitocondrial, inibição da enzima topoisomerase II e efeitos diretos na membrana (ASHLEY; POULTON, 2009; GEWIRTZ, 1999).

Porém, o estresse oxidativo induzido pela doxorubicina tem sido ressaltado como o principal mecanismo envolvido nos efeitos adversos deste antitumoral (ZHANG et al., 2009). De acordo com Granados-Principal et al. (2010), a produção de espécies reativas pela doxorubicina abrange quatro diferentes vias. A primeira compreende a produção de semiquinona, em que a doxorubicina é convertida em radical semiquinona e este reage com oxigênio molecular produzindo radical superóxido, que por sua vez, converte a doxorubicina em quinona. O ciclo quinona-semiquinona é responsável pela geração de grandes quantidades de radicais superóxido, os quais, subsequentemente, podem gerar outras espécies reativas como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e peroxinitrito. A ativação de NAD(P)H oxidase pela doxorubicina também representa uma condição relevante na geração de espécies reativas de oxigênio (GILLERON et al., 2009). Além disso, mecanismos não enzimáticos podem igualmente contribuir no aumento de espécies reativas. Peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e semiquinona podem promover a liberação de ferro a partir de ferritina, e a reação entre doxorubicina e ferro pode conduzir à formação de radicais hidroxila. Ainda, os produtos do metabolismo da doxorubicina podem promover a geração de espécies reativas (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010).

Inúmeras pesquisas têm sido direcionadas na busca por compostos que atenuem a excessiva produção de espécies reativas por agentes quimioterápicos como a doxorubicina. Estudos conduzidos com substâncias antioxidantes derivadas da dieta como vitamina A, selênio, carotenoides, coenzima Q e polifenóis têm identificado uma proteção sobre os danos induzidos pela doxorubicina em diferentes órgãos como coração, fígado e rim (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010).

Procianidinas extraídas de sementes de uvas foram eficazes na redução dos efeitos cardiotóxicos induzidos pela doxorubicina numa dose cumulativa de 15mg/Kg p.c. em ratos via supressão de estresse oxidativo (LI et al., 2009). Estudos *in vitro* identificaram que o ácido clorogênico, um dos compostos majoritários presentes na polpa do maná-cubiu, foi eficaz na proteção de cardiomiócitos frente

aos danos induzidos pela doxorubicina, principalmente devido à significativa redução da peroxidação lipídica (CHLOPČIKOVA et al., 2004).

Neste estudo, verificou-se que a polpa do maná-cubiu foi antimutagênica no sangue periférico nas doses de 250 e 375 mg/kg p.c. e na medula óssea de ratos Wistar na dose de 375 mg/Kg p.c. Os carotenoides e compostos fenólicos presentes na polpa do maná-cubiu, os quais apresentaram uma grande eficiência em desativar peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e radicais peroxila, evidenciada em ensaios apropriados, podem estar relacionados com o efeito observado.

4.3 Ensaio do cometa

4.3.1 Avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade no coração, fígado e sangue periférico

De acordo com as recomendações propostas por Tice et al. (2000), é necessário verificar a viabilidade celular antes da realização do ensaio do cometa, a qual deve ser preferencialmente superior a 70%.

Neste estudo, a viabilidade celular foi determinada por meio da técnica de exclusão de azul de tripan, a qual se baseia na avaliação da integridade da membrana celular. Células viáveis são impermeáveis ao corante azul de tripan, ao passo que em células com membrana celular comprometida ocorre a entrada do corante e estas adquirem uma coloração azul intensa (LONGO-SORBELLO et al., 2006). Os resultados dos experimentos, expressos na Tabela 5, apontaram que a viabilidade celular no tecido hepático foi superior a 71%, no tecido cardíaco foi maior do que 89% e no sangue periférico foi de 100%.

Tabela 5 - Média da viabilidade celular, em porcentagem, de coração e fígado de ratos Wistar tratados com a polpa do maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.)

Grupo	Viabilidade Celular (%)	
	Fígado	Coração
CN	76,39 ± 7,67	99,44 ± 0,50
DXR	79,54 ± 4,14	99,36 ± 1,13
MC 125	73,38 ± 6,69	99,66 ± 0,59
MC 250	76,52 ± 4,30	99,07 ± 1,32
MC 375	73,35 ± 5,61	96,82 ± 1,76
MC 500	80,68 ± 1,87	96,93 ± 0,90
MC 125+DXR	82,38 ± 6,85	89,61 ± 13,21
MC 250+DXR	78,77 ± 4,41	98,49 ± 0,09
MC 375+DXR	78,03 ± 5,18	99,17 ± 0,22
MC 500+DXR	71,43 ± 8,06	97,39 ± 1,67

Valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo (6 animais/grupo). CN: Controle negativo. Não houve diferença estatística entre os grupos, ANOVA e teste de Dunnett ($p > 0,05$)

Os resultados obtidos no ensaio do cometa em células hepáticas, cardíacas e sanguíneas estão apresentados na Figura 7. Os animais tratados com a polpa do maná-cubiu nas doses de 125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c. não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de DNA na cauda (%DNA) em células do coração, fígado e sanguíneas, em relação ao grupo controle negativo mostrando ausência de efeito genotóxico da polpa em estudo ($p > 0,05$).

O grupo tratado com doxorubicina apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) na %DNA na cauda em células cardíacas, hepáticas e sanguíneas quando comparados com o grupo controle negativo, validando assim nossos experimentos. Outros estudos recentes *in vivo* também demonstraram a genotoxicidade da doxorubicina em células cardíacas e hepáticas (DE AZEVEDO et al., 2011; MARTINS et al., 2012).

Figura 7. Valores médios $\pm$ desvio padrão da porcentagem de DNA na cauda (%DNA) em células do coração, fígado e sangue de ratos Wistar tratados com a polpa do maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.). Foram analisados 100 nucleoides por animal (6 animais/grupo). ^aEstatisticamente diferente do grupo CN (Controle Negativo); ^bEstatisticamente diferente do grupo DXR, ANOVA e teste de Dunnett ($p < 0,05$)

Em relação à associação da polpa do maná-cubiu e o antitumoral doxorrubicina, observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) da % DNA na cauda nas células cardíacas e hepáticas, sendo que a porcentagem de redução de danos foi de 61%, 61%, 76% e 70%, no tecido cardíaco e de 74%, 86%, 102% e 94% no tecido hepático para as doses de 125, 250, 375 e 500 mg/kg p.c. da polpa de maná-cubiu, respectivamente. Já no sangue periférico, os grupos tratados com as doses de 125, 375 e 500 mg/kg p.c. de maná-cubiu em associação à doxorrubicina apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) dos danos ao DNA em relação ao grupo controle positivo, e a porcentagem de redução de danos obtida foi de 95%, 94% e 107% para as doses de 125, 375 e 500 mg/kg p.c. da polpa de maná-cubiu, respectivamente.

O ensaio do cometa tem sido amplamente utilizado na investigação de danos associados com exposições à agentes genotóxicos (LOVELL; OMORI, 2008). É considerado um teste de alta sensibilidade e especificidade, simples e rápido na execução (TICE et al., 2000). A identificação do dano ao DNA pode ser realizada por meio de um modo visual, em que os cometas são classificados visualmente, em diferentes níveis de danos, ou ainda por meio de *softwares* que capturam e analisam as imagens dos cometas. Considerando a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados, a análise de nucleoides a partir de *softwares* é o método mais recomendado atualmente. Um dos parâmetros disponíveis no *software CometAssay IV*, o qual foi empregado neste trabalho, o *Tail intensity* compreende a % de DNA na cauda e constitui um dos parâmetros mais utilizados no estudo da genotoxicidade de compostos (BURLINSON et al., 2007, KUMARAVEL et al., 2009).

A princípio, o ensaio do cometa pode ser aplicado em qualquer tecido. De acordo com o protocolo de Tice et al. (2000), o órgão mais apropriado para realização do ensaio do cometa é o fígado. Este órgão representa um importante local de metabolização de substâncias absorvidas, e desta forma as células hepáticas estão expostas à altas concentrações de doxorrubicina. Assim, o fígado representa um dos órgãos afetados pelo tratamento com doxorrubicina (JAESCHKE, 2001). Além disso, aproximadamente 40% dos pacientes tratados com doxorrubicina desenvolvem algum tipo de dano hepático após a terapia (CARVALHO et al., 2009). O sangue é amplamente utilizado no ensaio do cometa, principalmente em estudos de biomonitoramento humano, uma vez que as células são facilmente obtidas

(DUSINSKA; COLLINS, 2008). Enquanto que alguns trabalhos sugerem o isolamento de linfócitos para determinação do dano oxidativo ao DNA, outros estudos propõem a utilização diretamente do sangue total no ensaio do cometa (AL-SALMANI et al., 2011), sendo esta última proposta utilizada na avaliação da genotoxicidade/antigenotoxicidade da polpa do maná-cubiu neste trabalho. O coração foi escolhido para avaliação de danos pelo ensaio do cometa considerando a relevante cardiotoxicidade observada em inúmeros estudos decorrente da administração do antitumoral doxorubicina (ALMEIDA et al., 2012; MARTINS et al., 2012). A utilização de vários órgãos de um mesmo animal tem se tornado uma prática recorrente em estudos de genotoxicidade. Trabalhos recentes na literatura mostram uma ampla avaliação dos danos ao DNA obtida de diversos órgãos de um mesmo animal, como fígado, coração, cérebro e rins (NAGAOKA et al., 2011; ZHENG et al., 2010).

Segundo Zeiger (2007), antes de assegurar que um composto possui ação antigenotóxica, uma avaliação minuciosa a cerca de uma possível ação genotóxica causada pelo composto também deve ser realizada por meio de protocolos apropriados. A partir dos resultados encontrados pelo ensaio do cometa, foi verificado que a polpa do maná-cubiu não foi genotóxica, além de ser eficaz na redução dos danos ao DNA em células hepáticas, cardíacas e sanguíneas expostas ao antitumoral doxorubicina. Até o momento, não foram descritos na literatura dados sobre a genotoxicidade e antigenotoxicidade da polpa do maná-cubiu.

A ação antigenotóxica de outros frutos já foi relatada em vários estudos. O extrato da polpa da acerola (*Malpighia glabra* L.) madura e não madura nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL minimizou significativamente a instabilidade genômica em células do sangue periférico de camundongos pelo ensaio do cometa (NUNES et al., 2011). O efeito protetor do extrato aquoso e orgânico da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) foi determinado por Miranda-Vilela et al. (2008) empregando o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo em camundongos. O ensaio do cometa foi realizado para avaliar a antigenotoxicidade de extratos de dois frutos do Cerrado brasileiro: murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich) e gabioba (*Campomanesia cambessedeanana* Berg), sendo verificada uma redução significativa dos danos oxidativos ao DNA induzidos por peróxido de hidrogênio no fígado de camundongos Swiss (MALTA et al., 2012).

Por meio do ensaio do cometa, foi evidenciada neste estudo a ação antígeno-tóxica da polpa do maná-cubiu em diferentes tecidos e doses, e este efeito pode estar relacionado com a presença de compostos carotenoides e fenólicos neste fruto.

Compostos bioativos presentes na dieta, como carotenoides e compostos fenólicos constituem um mecanismo de defesa importante sobre as espécies reativas de oxigênio, as quais em altas concentrações podem ser mediadores importantes de danos às estruturas celulares, DNA, proteínas e lipídios (VALKO et al., 2007).

Carotenoides compõem um amplo grupo de pigmentos sintetizados por plantas, fungos, algas e bactérias, mas não por animais e seres humanos (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004). Desde o isolamento do primeiro caroteno a partir da cenoura (*Daucus carota*) em 1831 (WOUTERSEN et al., 1999) já foram identificados mais de 600 carotenoides, contudo estudos indicam que aproximadamente 95% dos carotenoides totais encontrados no sangue de pessoas de diferentes países estão representados pelos carotenoides: β -caroteno, β -criptoxantina, α -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina (MAIANI et al., 2009). A estrutura química geral dos carotenoides envolve uma cadeia de 40 átomos de carbono, incluindo nove ligações duplas conjugadas e esta estrutura é responsável pela sua coloração característica. Várias ações biológicas dos carotenoides já foram descritas na literatura, destacando propriedades como a atividade antioxidante, atuação como precursores da vitamina A, proteção sobre danos oxidativos e doenças cardiovasculares e aumento da resposta imune (NAMITHA; NEGI, 2010).

Várias frutas e hortaliças de coloração laranja, verde ou vermelha apresentam uma quantidade considerável de diferentes carotenoides como β -caroteno, luteína e licopeno (NAMITHA; NEGI, 2010). Dentre os 17 carotenoides identificados na polpa do maná-cubiu, os compostos majoritários foram o β -caroteno, luteína, luteoxantina, violaxantina (Figura 8) (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013, 2012).

Figura 8. Estrutura química dos compostos carotenoides majoritários presentes na polpa do maná-cubiu. Adaptado de Melendez-Martínez et al., 2007

O β -caroteno é um dos carotenoides mais estudados e abundantes na dieta humana, sendo encontrado principalmente em frutas e hortaliças de coloração vermelha e amarela. Este pigmento apresenta uma potente ação antioxidante, com destaque para a ação sequestradora de oxigênio singlete, sendo esta característica relacionada à sua longa cadeia de duplas ligações conjugadas, o que possibilita a captação de espécies reativas (STAHL; SIES, 2005; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004). Nosso grupo de pesquisa evidenciou recentemente o efeito protetor do β -caroteno na sua forma pura ou microencapsulada nas doses de 2,5 mg/kg p.c ou 5mg/kg p.c. em ratos Wistar frente aos danos induzidos pelo antitumoral doxorrubicina (16 mg/kg p.c.) empregando o ensaio do cometa (AISSA et al., 2012).

Os resultados de outro estudo descrevem a proteção conferida pelo carotenoide luteína sobre o estresse oxidativo e danos ao material genético causados pelo antitumoral cisplatina em ensaios com a linhagem celular HepG2 (derivadas de hepatoblastoma humano) (SERPELONI et al., 2012). Tanto em humanos, como nas plantas, acredita-se que a luteína apresenta duas principais funções: filtrar a luz azul de alta energia e atuar como antioxidante no sequestro de espécies reativas de oxigênio induzidas pela luz (ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2004).

Os efeitos biológicos da luteoxantina e violaxantina têm sido menos investigados em comparação a outros carotenoides. Estes pigmentos pertencem a uma subclasse dos carotenoides denominada xantofilas, a qual também inclui a luteína, apresentando em sua estrutura grupos hidroxilas (KHOO et al., 2011). Estudos sugerem que as xantofilas exibem uma potente atividade antioxidante e fotoprotetora, devido à sua estrutura química favorável para captar espécies reativas de oxigênio (RUBAN; JOHNSON, 2010).

Os compostos fenólicos representam uma grande variedade de substâncias que possuem em sua estrutura um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila. Constituem metabólitos secundários de grande importância para crescimento e reprodução de plantas, proporcionando um sistema de defesa eficiente contra patógenos e predadores. Devido à ampla distribuição no reino vegetal, bem como a potente atividade antioxidante exercida por muitos destes compostos, inúmeras pesquisas têm sido direcionadas à avaliação de possíveis efeitos na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo (DAI; MUMPER, 2010). Alguns estudos ainda destacam as propriedades exercidas pelos compostos fenólicos como atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e antiaterosclerótica. No entanto, os efeitos benéficos exercidos pelos compostos fenólicos dependerão da quantidade consumida diariamente bem como de sua biodisponibilidade (CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010).

Estudos propõem que as propriedades antioxidantes exercidas pelos compostos fenólicos são mediadas pelos seguintes mecanismos: desativação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; supressão da formação de espécies reativas por meio da inibição de algumas enzimas ou quelação de metais envolvidos na produção de espécies reativas; ou ainda pelo aumento do sistema antioxidante de defesa (DAI; MUMPER, 2010).

Os compostos fenólicos são classificados de acordo com o número de anéis aromáticos que possuem e os elementos estruturais que ligam estes anéis, sendo que os principais grupos são: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas (EL GHARRAS, 2009).

Os ácidos fenólicos são divididos em ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzoicos. Eles apresentam atividade antioxidante como quelantes e sequestradores de espécies reativas com especial ação sobre radicais hidroxilas e peroxilas, ânions superóxido e peroxinitritos (CAROCHO; FERREIRA, 2013). O ácido clorogênico, ou ácido 5-cafeoilquínico, compreende um dos ácidos fenólicos mais abundantes na dieta humana, estando presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal como o café, maçã, tomate, entre outros (LAFAY et al., 2006). Alguns estudos têm mostrado uma baixa absorção intestinal do ácido clorogênico, no entanto os produtos da sua hidrólise, promovida pela flora intestinal, como metabólitos de ácidos aromáticos incluindo o ácido cafeico e o ácido quínico,

podem ser encontrados em abundância no plasma e na urina (GONTHIER et al., 2003).

Na polpa do maná-cubiu, o ácido clorogênico foi o composto mais abundante presente no extrato fenólico (1298 µg/g de polpa), representando mais de 70% do total de compostos fenólicos encontrados neste fruto (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013). Apesar da baixa biodisponibilidade deste composto, efeitos protetores atribuídos aos seus metabólitos, como os ácidos cafeico, ferúlico e quínico também têm sido evidenciados em vários estudos.

A administração de ácido clorogênico em camundongos preveniu lesões gástricas induzidas por diferentes etiologias, além de restabelecer as concentrações de glutathione e reduzir as concentrações de TBARS em comparação aos animais tratados com etanol/HCl (SHIMOYAMA et al., 2013). No fígado, a administração de ácido clorogênico reduziu a inflamação e fibrose em ratos tratados com tetracloreto de carbono (SHI et al., 2009).

O ácido cafeico e o ácido clorogênico possuem propriedades antioxidantes, demonstradas pelas suas capacidades em sequestrar espécies reativas quando testados *in vitro* ou *in vivo* (GULCIN, 2006; SATO et al., 2011). A redução da instabilidade genômica induzida por raios-X em linfócitos humanos foi evidenciada em um estudo com os ácidos quínico e clorogênico empregando o ensaio do cometa (CINKILIC et al., 2012).

No extrato fenólico da polpa do maná-cubiu também foram identificadas duas espermidinas. Descobertas em 1678 por Antonie van Leeuwenhoek, as poliaminas espermidina e espermina estão presentes em todos os organismos celulares (WALLACE, 2009). Estes compostos podem ser obtidos via endógena, por meio de síntese intracelular, ou exógena, através de síntese na flora intestinal e pela dieta, incluindo principalmente, queijos, frutas e carnes. As poliaminas apresentam um papel importante na regulação do crescimento e proliferação celular, na síntese proteica, na regulação do sistema imune e na apoptose (LARQUE; SABATER-MOLINA; ZAMORA, 2007).

A ação sinérgica dos diferentes compostos bioativos presentes na polpa do maná-cubiu pode estar envolvida nos efeitos protetores em células cardíacas, hepáticas e sanguíneas evidenciados pelo ensaio do cometa. Liu (2004) descreve que os efeitos benéficos de uma dieta rica em frutas e hortaliças são atribuídos à complexa composição de compostos bioativos presentes nestes alimentos. Estes

compostos apresentam-se em diferentes tamanhos moleculares, polaridades, solubilidades, podendo alterar a biodisponibilidade e a distribuição de cada composto bioativo. Assim, compostos isolados podem se comportar de uma forma diferente em relação aos encontrados nos alimentos. Liu (2003) recomenda que antioxidantes sejam obtidos a partir de uma dieta rica em frutas e hortaliças, evitando suplementos nutricionais que podem não conter a combinação balanceada de compostos bioativos presentes nestes alimentos. Almeida et al. (2012) ainda ressalta a importância dos estudos com polpas de frutas inteiras, ao invés de compostos isolados ou extratos, com o objetivo de determinar mais precisamente os efeitos de compostos bioativos após a ingestão de frutas, como ocorre na dieta humana.

4.4 Análise das concentrações de TBARS e GSH no fígado e coração de ratos

Várias metodologias foram desenvolvidas com intuito de determinar o estresse oxidativo, sendo a maioria direcionada na quantificação direta ou indireta de produtos oxidados de lipídios, como o malondialdeído (MDA), proteínas carboniladas ou DNA (8-hidroxi-2-deoxiguanosina) (DALLE-DONNE et al., 2006). O MDA formado após processos oxidativos em lipídios pode ser determinado por meio da reação com ácido tiobarbitúrico (TBA), resultando na formação de um complexo de coloração rósea, sendo quantificado em análises espectrofotométricas a 535 nm (BUEGE; AUST, 1978).

A quantificação de GSH é outro importante biomarcador de estresse oxidativo e existem na literatura diversos métodos analíticos disponíveis para a detecção de GSH em diferentes matrizes biológicas (MONOSTORI et al., 2009). O método que emprega a espectrofotometria destaca-se por ser simples e acessível, baseando-se na reação de grupos sulfidrilas, presentes na molécula de GSH, com o ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) ou DTNB, gerando um composto amarelo denominado ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

Os resultados referentes à determinação de glutathiona reduzida e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido cardíaco e hepático estão apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. A doxorubicina não induziu depleção de GSH em relação ao grupo controle negativo nos tecidos hepático ou cardíaco ($p > 0,05$). Além disso, os animais tratados com a polpa do maná-cubiu nas doses 125, 250,

375 e 500 mg/kg p.c. não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de GSH nos tecidos cardíacos e hepáticos em relação ao grupo controle negativo ($p>0,05$).

No tecido hepático, a associação do maná-cubiu na dose de 375 mg/kg p.c. e a doxorrubicina apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) nas concentrações de GSH em relação aos grupos controle negativo ou positivo. Nota-se ainda que as concentrações de GSH no tecido hepático foram superiores em relação aos obtidos no tecido cardíaco em todos os grupos de tratamento. As concentrações de GSH podem variar consideravelmente entre os diferentes órgãos, no entanto, estudos demonstram a presença de GSH principalmente no fígado (LU, 2009).

Em relação à determinação das concentrações de TBARS apresentados na Figura 10, os animais tratados somente com doxorrubicina demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo tanto no tecido hepático como cardíaco ($p<0,05$). A associação da polpa do maná-cubiu na dose 125 mg/kg p.c. e o antitumoral doxorrubicina reduziu significativamente as concentrações de TBARS no coração em relação ao grupo controle positivo ($p<0,05$). Já em relação ao tecido hepático, uma redução significativa foi encontrada para as doses 250, 375 e 500 mg/kg p.c. do maná-cubiu associadas ao antitumoral doxorrubicina ($p<0,05$).

Figura 9. Avaliação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em fígado e coração de ratos Wistar tratados com a polpa do maná-cubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.). Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo (6 animais/grupo). CN: Controle negativo. ^a Estatisticamente diferente do grupo CN, ^b Estatisticamente diferente do grupo DXR. ANOVA e teste de Dunnett ($p<0,05$)

Figura 10. Avaliação das concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado e coração de ratos Wistar tratados com a polpa do manacubiu (MC) em diferentes doses (125, 250, 375 ou 500 mg/kg p.c.), associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.). Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo (6 animais/grupo). CN: Controle negativo. ^a Estatisticamente diferente do grupo CN, ^b Estatisticamente diferente do grupo DXR. ANOVA e teste de Dunnett ($p < 0,05$)

A depleção de glutathiona induzida pela doxorrubicina não foi identificada neste trabalho, provavelmente pelo curto período de exposição deste antitumoral, o qual foi de 24 horas. Neste estudo, os animais foram eutanasiados 24 horas após a aplicação da doxorrubicina, considerando o tempo recomendado para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo. De acordo com o protocolo estabelecido por Tice et al. (2000), no ensaio do cometa é proposta a utilização de dois tempos amostrais, de 3 a 6 horas ou 22 a 26 horas, após um tratamento agudo. Em relação ao teste do micronúcleo, é aconselhado que em estudos de dose repetida, a medula óssea seja coletada dentro de 24 horas após o último tratamento, e para o sangue periférico, o prazo máximo é de 40 horas após o tratamento com a substância teste (HAYASHI et al., 2000).

Outros trabalhos demonstraram a alteração de parâmetros de estresse oxidativo induzida pela doxorrubicina, entretanto os tecidos foram coletados após 48 horas da aplicação deste agente. Rashikh et al. (2011) identificaram no tecido cardíaco a depleção de GSH em ratos Wistar que receberam via intraperitoneal 20 mg/kg p.c. de doxorrubicina e eutanasiados após 48 horas do tratamento com o agente antitumoral. Fígado, rim, pulmão e cérebro de ratos Wistar mostraram um

aumento significativo nas concentrações de TBARS e uma redução nas concentrações de GSH, decorrente da aplicação de doxorrubicina (45 mg/kg p.c), sendo que os animais foram submetidos à eutanásia 48 horas após o tratamento com o antitumoral (OZ; ILHAN, 2006).

A administração de doxorrubicina nos animais induziu a peroxidação lipídica nos tecidos cardíacos e hepáticos, apesar de ter sido empregada neste presente estudo uma dose menor em relação a outros trabalhos, bem como um menor tempo de exposição deste antitumoral (24 horas). Outros estudos empregando doses superiores também verificaram a indução da peroxidação lipídica pelo antitumoral doxorrubicina. Patel et al. (2010) identificaram um aumento significativo nas concentrações de TBARS no fígado de camundongos após a aplicação de 60 mg/kg p.c. de doxorrubicina. A aplicação intraperitoneal de doxorrubicina em ratos, na dose de 90 mg/kg p.c., aumentou significativamente as concentrações de TBARS no fígado dos animais 24 horas após a aplicação (DOS SANTOS, et al., 2007).

Apesar das espécies reativas de oxigênio exercerem funções importantes em inúmeros processos fisiológicos do organismo, o seu aumento pode representar sérias disfunções celulares (ALFADDA; SALLAM, 2012). A produção demasiada de espécies reativas de oxigênio principalmente em condições patológicas como inflamações crônicas e infecções virais tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo, acarretando em danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios (NIKI, 2012). Os danos ocasionados por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em ácidos graxos poli-insaturados de membrana, por exemplo, podem conduzir a um processo denominado peroxidação lipídica, o qual leva à formação de vários produtos, como aldeídos, especialmente o malondialdeído, pentanos, isoprostanos e dienos conjugados. O produto malondialdeído tem sido relacionado a vários efeitos danosos às macromoléculas celulares, principalmente ao DNA devido à formação de adutos, e consequentes quebras em sua estrutura (VALKO et al., 2006).

Uma dieta rica em antioxidantes parece ser um importante recurso na minimização de efeitos deletérios desencadeados por espécies reativas de oxigênio (GORDON, 2012). Vários estudos demonstram a eficácia de compostos como resveratrol, licopeno e β -caroteno na neutralização de espécies reativas de oxigênio (BOHM; EDGE; TRUSCOTT, 2012; DI MASCO; KAISER; SIES, 1989; HOLTHOFF et al., 2010).

A combinação de diferentes antioxidantes presentes em frutas e hortaliças, por exemplo, parece atuar de modo sinérgico, aumentando a efetividade da prevenção de danos oxidativos às células e tecidos (BREWER, 2011). Elberry et al.(2010) verificaram que a administração oral por 10 dias do extrato do fruto *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*) na dose de 100 mg/kg p.c. em ratos Wistar promoveu uma proteção frente aos danos induzidos pelo antitumoral doxorrubicina (15 mg/kg p.c.) no coração dos animais, como inibição da depleção de GSH. Os danos ao DNA induzidos pela doxorrubicina (10mg/kg p.c.) no coração de ratos Wistar diminuíram significativamente devido o tratamento prévio durante 18 dias com o extrato do fruto romã (*Punica granatum* L.) (FARD et al., 2011).

Na fase inicial da peroxidação lipídica ocorre a abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado que pode ser desencadeada por espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxila, conduzindo à formação de radicais lipídicos. Na etapa seguinte, a reação de oxigênio com os radicais lipídicos produz radicais peroxila, os quais são altamente reativos e podem interagir com uma nova molécula de ácido graxo poli-insaturado. Assim, a interceptação destes radicais pelos antioxidantes representa um alvo importante na prevenção de efeitos deletérios nas células (LOBO et al., 2010).

Neste estudo, tanto no tecido hepático como no cardíaco foram encontradas reduções significativas nas concentrações de TBARS em grupos tratados com determinadas doses da polpa do maná-cubiu. Esse efeito protetor pode estar relacionado com a presença de compostos bioativos como carotenoides e compostos fenólicos na polpa do maná-cubiu. Além disso, sugere-se que a potente ação na desativação de radicais peroxila, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso evidenciada nos estudos de Rodrigues, Mariutti e Mercadante (2013) esteja envolvida na redução da concentração de TBARS induzida pela polpa do maná-cubiu no fígado e no coração de animais tratados com doxorrubicina.

4.5 Análise da expressão relativa do RNAm do gene COX-2

4.5.1 Avaliação qualitativa e quantitativa do RNA total

Na análise da expressão de RNAm por RT-qPCR, é essencial que as amostras de RNA estejam íntegras e apresentem um alto grau de pureza, uma vez

que a utilização de RNA de baixa qualidade pode comprometer fortemente os resultados experimentais (FLEIGE; PFAFFL, 2006).

As razões $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$ fornecem informações relevantes quanto à contaminação por proteínas, DNA, compostos orgânicos e sais, sendo viável que as amostras de RNA apresentem razão $A_{260/230}$ entre 1,7 e 2,2 e razão $A_{260/280}$ entre 1,8 e 2,0. Os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7 mostram que a extração foi eficiente tanto no fígado como no coração, e desta forma o RNA extraído dos diferentes grupos de tratamento pode ser utilizado nos ensaios posteriores.

Tabela 6 - Quantificação do RNA total e razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} de amostras de fígado de ratos Wistar tratados com polpa de maná-cubiu (MC 375 mg/kg p.c.) associada ou não à doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.)

Grupo	Concentração (ng/uL)	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$
Controle negativo	4172	2,19	1,83
DXR	2652	2,14	1,81
MC 375	1894	1,93	1,82
MC 375 + DXR	3115	2,26	1,81

Tabela 7 - Quantificação do RNA total e razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} de amostras de coração de ratos Wistar tratados com polpa de maná-cubiu (MC 375 mg/kg p.c.) associada ou não à doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.)

Grupo	Concentração (ng/uL)	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$
Controle negativo	329	1,84	1,87
DXR	615	2,01	1,87
MC 375	719	2,19	1,85
MC 375 + DXR	468	2,15	1,87

A avaliação da integridade do RNA total extraído foi determinada com base na verificação da presença de bandas de RNA ribossômicos (RNAr) 18S e 28S como mostrado na Figura 11. A ausência de rastros indica que o RNA não está degradado e que não houve contaminação por DNA genômico (FARRELL JR, 2010). Assim, as amostras de RNA total estavam íntegras e com boa qualidade para a realização da RT-qPCR.

Figura 11. Avaliação qualitativa da integridade do RNA total em gel de agarose (1%) de amostras de fígado (em A) e coração (em B) de ratos Wistar. Em (1): marcador de peso molecular -1 Kpb; (2): grupo controle negativo; (3): grupo doxorubicina; (4): grupo maná-cubiu 375mg/Kg p.c; (5): grupo maná-cubiu 375mg/Kg p.c + doxorubicina. Quantidade de RNA por poço: 1 µg.

4.5.2 Análise da expressão relativa de RNAm do gene *COX-2*

Com o intuito de evitar erros experimentais decorrentes de variações na quantidade e integridade do RNA, bem como da eficiência da reação, a normalização constitui-se um passo essencial na RT-qPCR (HU et al., 2009). A inclusão de um ou mais de genes de referência tem se mostrado a prática mais comumente utilizada para normalização de ensaios de RT-qPCR (TONG et al., 2009).

Um gene de referência ideal deve ser transcrito invariavelmente em diferentes tecidos e condições experimentais (RADONIC et al., 2004). No entanto, alguns estudos têm mostrado que a expressão de genes de referência pode variar consideravelmente, acarretando em erros de normalização de dados da RT-qPCR (DHEDA et al., 2004). Desta maneira, é recomendável que seja avaliado se os genes de referência sofrem alguma variação de expressão relevante entre os grupos experimentais (THELLIN et al., 2009). Dentre os genes de referência avaliados neste estudo, beta-actina (*Actb*) e proteína ribossomal S29 (*Rps29*) apresentaram menores variações independentemente dos grupos experimentais, e deste modo foram utilizados na normalização dos dados obtidos na RT-qPCR.

De acordo com as diretrizes estabelecidas por Bustin et al.(2009), a eficiência (E) da amplificação da PCR pode ser calculada por meio de uma curva padrão, a qual fornece uma indicação rápida, simples e reprodutível da média da eficiência de

cada *primer* avaliado. A amplificação pode ser determinada a partir do *slope* da curva padrão usando a equação:

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$$

O ensaio apresentará eficiência 100% quando E for igual a 1, indicando que a quantidade de produtos formados dobra a cada ciclo durante a fase geométrica da PCR (BUSTIN et al., 2009). Neste estudo, os *primers* COX-2, *Actb* e *Rps29* apresentaram eficiência de amplificação entre 90% e 110%, sendo estes valores considerados aceitáveis dentro do estabelecido para a garantia de qualidade do ensaio (RAYMAEKERS et al., 2009).

A Figura 12 representa o gráfico da expressão relativa de RNAm do gene COX-2 no tecido hepático. O tratamento com a polpa de maná-cubiu (375 mg/kg p.c.) não alterou a expressão relativa de RNAm em relação ao grupo controle negativo, por outro lado, os grupos tratados com doxorrubicina apresentaram um aumento significativo da expressão relativa de RNAm do gene COX-2 em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). A associação da polpa de maná-cubiu (375 mg/kg p.c.) e o antitumoral doxorrubicina também apresentou um aumento significativo da expressão relativa de RNAm do gene COX-2 em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). Já no coração, não houve amplificação do RNAm do gene COX-2 nos diferentes grupos experimentais.

Figura 12. Expressão relativa de RNAm do gene COX-2 em fígado de ratos Wistar tratados com polpa de maná-cubiu (MC 375 mg/kg p.c.) associada ou não à doxorrubicina (DXR, 16 mg/kg p.c.). ^aEstatisticamente diferente do grupo controle negativo(CN). ANOVA e teste de Dunnett ($p < 0,05$). Os dados foram normalizados com os genes *Rps29* e *Actb*

Os métodos mais habitualmente utilizados na análise dos dados de RT-qPCR são a quantificação absoluta e a relativa. A primeira determina o número de cópias do RNAm de interesse, relacionando-o com os dados obtidos a partir de curva padrão, enquanto que a quantificação relativa permite a análise de alterações de um determinado gene alvo em relação à um gene de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

Livak e Schmittgen (2001) propõem a utilização do método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para o cálculo das alterações relativas da expressão de RNAm em um experimento de RT-qPCR. No entanto, este método pode ser empregado somente se a eficiência da amplificação do gene alvo e a eficiência da amplificação do gene de referência forem aproximadamente iguais. Esta determinação pode ser realizada por meio de uma curva de regressão linear, analisando como os valores de ΔC_q (*quantification cycle*), obtido pela diferença entre o C_q do gene alvo e o C_q do gene de referência, variam a partir de diferentes concentrações de cDNA. Os genes alvo e referência com eficiências semelhantes apresentam *slope* menor que 0,1 ao passo que os genes que não possuem eficiências equivalentes exibem *slopes* maiores que 0,1 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

Nos experimentos de validação, o gene *COX-2* e os genes de referência *Actb* e *Rps29* apresentaram valores de *slope* maiores que 0,1, o que implica que a eficiência de amplificação do genes alvo e do gene de referência não foi semelhante.

Pfaffl (2001) descreve um método matemático para o cálculo da expressão relativa em que os genes não necessitam apresentar eficiências semelhantes. Nesta proposta, as eficiências dos genes alvo e referência são incluídas na equação e, portanto diferenças entre estes parâmetros são contabilizados no cálculo. A fórmula aritmética deste método é:

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta C_q \text{ gene alvo (Cq controle - Cq amostra)}}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta C_q \text{ gene referência (Cq controle - Cq amostra)}}$$

Onde,

E = eficiência; gene alvo = gene de estudo; $C_{q_{\text{controle}}}$ = C_q da amostra do grupo controle; $C_{q_{\text{amostra}}}$ = C_q da amostra do grupo de tratamento

Assim, os dados de expressão relativa dos RNAm do gene COX-2 foram calculados a partir do método proposto por Pfaffl (2001).

A expressão gênica pode ser regulada em várias etapas por compostos bioativos presentes nos alimentos. Desta forma, a análise das alterações da expressão de RNAm por componentes da dieta constitui, frequentemente, o primeiro passo na investigação das informações moleculares do genoma ao proteoma e metaboloma, representando ainda um dos objetivos principais de vários grupos de pesquisa em Nutrigenômica (MULLER; KERSTEN, 2003). Neste estudo, verificou-se que a administração da polpa do maná-cubiu não modulou a expressão relativa dos transcritos do gene COX-2 tanto no tecido hepático, quando isolada ou em associação ao antitumoral doxorubicina.

Compostos da dieta têm sido estudados quanto à modulação de genes pró-inflamatórios como o gene COX-2. Ensaios *in vitro* com a linhagem de câncer hepático HA22T/VGH demonstraram diminuição da expressão relativa de RNAm do gene COX-2 perante o tratamento com curcumina, um composto polifenólico (NOTARBARTOLO et al., 2005). Li et al. (2012) estudaram os efeitos de extratos de semente de uva em camundongos expostos aos agente hepatotóxico tioacetamida e apesar de encontrarem uma redução na expressão relativa de RNAm do gene COX-2 no fígado dos animais, essa depressão não foi significativa em relação ao grupo controle positivo.

A associação entre a inflamação e o câncer tem sido evidenciada em vários estudos clínicos e epidemiológicos (MANTOVANI et al., 2008). As prostaglandinas, sintetizadas pela COX-2, são necessárias na manutenção da homeostase celular, no entanto, vários estudos indicam que estas substâncias parecem exercer um papel crítico na carcinogênese, sendo que concentrações elevadas de prostaglandinas têm sido observadas em diversos tipos de cânceres (SURH; KUNDU, 2007; WANG; DUBOIS, 2006).

A inibição da enzima COX-2 tem sido proposta como um alvo na prevenção e tratamento do câncer (BREINIG; SCHIRMACHER; KERN, 2007). Uma meta-análise realizada com os estudos epidemiológicos existentes na literatura sobre o risco de desenvolvimento do câncer e o uso de anti-inflamatórios relatou que inibidores não seletivos e seletivos de COX-2, como ibuprofeno e celocoxibe, respectivamente, reduziram o risco de desenvolvimento de quatro tipos de cânceres: cólon, mama, próstata e pulmão (HARRIS, 2009). Por outro lado, a coadministração de diclofenaco

de sódio, um inibidor de ciclooxigenase, e doxorrubicina em ratos agravou a indução de danos cardíacos, acompanhado de aumento nas concentrações de TBARS (DOWD et al., 2001).

As isoformas COX-1 e COX-2 participam da síntese de eicosanoides, como prostaglandinas e tromboxanos, a partir de ácido araquidônico. Estas substâncias estão envolvidas em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos como a inflamação e o câncer. Já é bem descrito na literatura as diferenças na expressão destas enzimas, sendo que a COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, ao passo que a estimulação da expressão da COX-2 requer determinadas substâncias como fatores de crescimentos, citocinas, hormônios e quimioterápicos (MOREIRA; CASTELLS, 2011; SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000). O gene COX-2 possui sítios de ligação para vários fatores regulatórios de transcrição incluindo o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), a proteína ativadora-1(AP-1), entre outros (HARPER; TYSON-CAPPER, 2008; TANABE; TOHNAI, 2002).

Neste presente estudo, o aumento da expressão de RNAm do gene COX-2 no fígado de animais tratados com doxorrubicina pode estar associado às vias de ação deste antitumoral. Uma das características de vários agentes antitumorais, incluindo a doxorrubicina, é ativação da via de sinalização do NF-kB, a qual regula a expressão de vários genes envolvidos em processos como apoptose, proliferação celular e inflamação. No entanto, os mecanismos responsáveis pela ativação desta via pelos agentes antitumorais ainda não foram completamente elucidados (JANSSENS; TSCHOPP, 2006; LIANG et al., 2013).

Um estudo de Kim et al. (2001) identificou alterações na expressão dos transcritos do gene COX-2 no tecido cardíaco de ratos Fischer 344 relacionadas à idade dos animais. As concentrações de RNAm do gene COX-2 eram significativamente maiores em ratos senis, com aproximadamente 24 meses de idade, ao passo que animais jovens, com 6 meses de idade, apresentavam quantidades baixíssimas de transcritos do gene COX-2. Ensaios imunohistoquímicos mostraram a indução da enzima COX-2 no tecido cardíaco de ratos Sprague-Dawley após 4 horas da aplicação intraperitoneal de doxorrubicina (15mg/kg p.c.), estando ausente no grupo controle (DOWN et al., 2001).

No presente estudo não foi detectada a expressão de RNAm do gene COX-2 por RT-qPCR no tecido cardíaco de grupos controle positivo ou negativo, assim como de grupos tratados com a polpa do maná-cubiu.

4.6 Determinação dos elementos químicos presentes na polpa do maná-cubiu

Na Tabela 8 estão apresentados os 50 elementos químicos determinados por ICP-MS na polpa liofilizada do maná-cubiu. Dentre os elementos químicos analisados, zinco (1,28 mg/ 100g de polpa liofilizada) e manganês (0,59 mg/ 100g de polpa liofilizada) apresentaram quantidades semelhantes aos encontrados por Marx, Andrade e Maia (1998) na determinação da composição do maná-cubiu, ao passo que selênio (0,021 mg/ 100g de polpa liofilizada) foi encontrado em quantidades menores em relação aos estudos destes mesmos autores. Cabe destacar que os frutos analisados por Marx, Andrade e Maia (1998) foram coletados em Belém (Pará), enquanto que os frutos utilizados neste estudo presente foram adquiridos em São Paulo, e o local de cultivo pode influenciar amplamente na quantidade de minerais presentes em um determinado alimento.

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) refere-se à quantidade de vitaminas, minerais e proteínas que deve ser consumida diariamente com o intuito de atender às necessidades nutricionais dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia (ANVISA, 1998). Considerando a maior dose de 500 mg/ kg p.c. empregada neste estudo, equivalente a dois frutos e meio, as quantidades dos elementos-traço zinco, manganês e selênio estão bem abaixo da IDR para adultos recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que é de 15 mg, 5 mg e 70 µg, respectivamente.

Cobre e cromo também integram a tabela de IDR para adultos, mas igualmente aos elementos-traço já citados, as quantidades encontradas na polpa do maná-cubiu não atingem os valores propostos para estes elementos que é de 3 mg e 200 µg, respectivamente.

Tabela 8 -Determinação dos elementos químicos presentes na polpa liofilizada do maná-cubiu por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Elemento Químico	Concentração (mg/100g de polpa liofilizada)	Elemento Químico	Concentração (mg/100g de polpa liofilizada)
Boro (B)	0,46039	Íterbio (Yb)	0,00005
Germânio (Ge)	<LD	Arsênio (As)	0,00019
Nióbio (Nb)	0,00002	Chumbo (Pb)	0,05625
Rênio (Re)	<LD	Cádmio (Cd)	0,00073
Tântalo (Ta)	<LD	Níquel (Ni)	0,08286
Titânio (Ti)	0,47433	Cobre (Cu)	0,84769
Tungstênio (W)	0,00074	Zinco (Zn)	1,27982
Ziroônio (Zr)	0,00011	Manganês (Mn)	0,59261
Molibdênio (Mo)	0,01355	Selênio (Se)	0,02146
Cério (Ce)	0,00336	Cobalto (Co)	0,03741
Disprósio (Dy)	0,00013	Crômio (Cr)	0,13713
Érbio (Er)	0,00007	Bário (Ba)	1,25122
Európio (Eu)	0,00114	Rubídio (Rb)	3,78069
Gadolínio (Gd)	0,00033	Urânio (U)	0,00007
Hólmio (Ho)	0,00002	Césio (Cs)	0,02698
Lantânio (La)	0,00184	Vanádio (V)	<LD
Lutécio (Lu)	<LD	Prata (Ag)	0,00029
Neodímio (Nd)	0,00087	Alumínio (Al)	0,50887
Praseodímio (Pr)	0,00025	Berílio (Be)	0,00214
Escândio (Sc)	<LD	Bismuto (Bi)	0,00018
Samário (Sm)	0,00173	Gálio (Ga)	0,03062
Térbio (Tb)	0,00004	Índio (In)	<LD
Tório (Th)	0,00036	Lítio (Li)	0,04166
Túlio (Tm)	0,00002	Estrôncio (Sr)	0,63610
Ítrio (Y)	0,00045	Tálio (Tl)	0,00556

LD: Limite de detecção

Os elementos-traço zinco, manganês, selênio, cobre e crômio pertencem à categoria de micronutrientes, uma vez que quantidades muito pequenas, geralmente menos de 100 mg ao dia, são requeridas diariamente para atender às necessidades nutricionais do organismo humano. Estes micronutrientes representam componentes essenciais para a manutenção da saúde humana, contribuindo para o desenvolvimento ósseo, sistema imune e atuando como cofatores de enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase e superóxido dismutase (FRAGA, 2005).

Ressalta-se ainda a baixa quantidade encontrada do elemento químico arsênio na polpa liofilizada do maná-cubiu. A exposição humana crônica ao arsênio tem sido associada ao desenvolvimento de várias doenças, sendo também evidenciados em alguns estudos a indução de genotoxicidade e o aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (JOMOVA et al., 2011).

Vários estudos *in vitro* ou *in vivo* indicam que os diversos compostos presentes nos alimentos atuam de modo sinérgico por meio de mecanismos complementares, contribuindo para um determinado efeito biológico. Por outro lado, compostos puros isolados podem exibir um comportamento diferente, ou mesmo apresentar uma menor atividade biológica em relação à sua atividade quando presente em uma matriz alimentar (DE KOK; VAN BREDA; MANSON, 2008). Logo, os compostos presentes na polpa do maná-cubiu parecem atuar de modo sinérgico, levando aos efeitos observados neste estudo.

O Brasil, ao contrário de muitos países, privilegia-se com a incrível biodiversidade estabelecida em suas florestas tropicais, com destaque para a Floresta Amazônica. A variedade incalculável de frutas e vegetais encontradas nesta região ainda é pouco explorada, apesar de constituírem fontes notáveis de compostos bioativos. Nos últimos anos, pesquisas em torno da identificação de compostos bioativos presentes em frutos amazônicos têm sido amplamente desenvolvidas, sendo intensificados igualmente os estudos dos efeitos biológicos destes recursos naturais (DA SILVA et al., 2012; GENOVESE et al., 2008). O Brasil se destaca como terceiro maior produtor de frutas mundialmente, estando atrás somente da China e da Índia, contudo o consumo destes alimentos no Brasil ainda é muito reduzido. Uma pesquisa realizada pela Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil identificou que apenas 18,2% dos brasileiros ingerem a quantidade recomendada de frutas e hortaliças pela Organização Mundial da Saúde, estabelecida em 400 gramas diárias (KIST et al., 2012).

Há mais de cinco anos, nosso grupo de pesquisa tem se consolidado na investigação de efeitos biológicos de frutos da Amazônia como açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), buriti (*Mauritia flexuosa*), guajiru (*Chrysobalanus icaco*), juçara (*Euterpe edulis*) e piquiá (*Caryocar villosum*), contribuindo assim na divulgação destes recursos naturais ainda pouco explorados comercialmente e pela comunidade científica.

O consumo de maná-cubiu ainda é restrito, principalmente em centros afastados da Região Norte, no entanto percebe-se um aumento da aceitabilidade de frutos típicos da Amazônia como o açaí e cupuaçu. A facilidade de cultivo aliada a aspectos nutricionais tornam o maná-cubiu um potencial econômico para mercados nacionais e internacionais.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, nas condições empregadas neste estudo, pode-se concluir que a polpa do maná-cubiu:

- Não apresentou efeitos genotóxicos em células hepáticas, cardíacas e sanguíneas, nem mutagênicos ou citotóxicos em células da medula óssea e sangue periférico de ratos Wistar;
- Reduziu a frequência de micronúcleos induzidos pela doxorrubicina em sangue periférico nas doses de 250 e 375 mg/kg p.c., e na medula óssea somente a dose 375 mg/kg p.c. foi capaz de reduzir os danos ao DNA em ratos Wistar tratados com doxorrubicina;
- Protegeu o DNA dos danos induzidos pela doxorrubicina em células cardíacas, hepáticas e sanguíneas de ratos Wistar, no ensaio do cometa;
- Reduziu as concentrações de TBARS nas doses de 250, 375 e 500 mg/kg p.c em células hepáticas e na dose de 125 mg/kg p.c em células cardíacas de ratos Wistar;
- Não teve influência sobre a transcrição do RNAm do gene COX-2 no tecido hepático de ratos Wistar, quando associada ou não ao antitumoral doxorrubicina;
- Apresentou em sua composição os elementos-traço zinco, manganês, selênio, cobre, crômio determinados por ICP-MS, mas não em quantidades significativas.

Referências

6. REFERÊNCIAS ¹

ABDEL-AZIZ, H., et al. Toxicological studies on a standardized extract of *Solanum indicum* ssp. *distichum*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 903-909, 2011.

ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; GRAWE, J.; ZETTERBERG, G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: the response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. **Mutation research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 423, n. 1-2, p. 113-124, 1999.

AGAPITO, M. T., et al. Protective effect of melatonin against adriamycin toxicity in the rat. **Journal of pineal research**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 23-30, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Portaria n º 33, de 13 de janeiro de 1998.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/33_98.htm. Acesso em: 02 de fevereiro de 2013.

AGRAWAL, R. C.; BEOHAR, T. Chemopreventive and Anticarcinogenic Effects of *Momordica Charantia* Extract. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 11, n. 2, p. 371-375, 2010.

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

AL-SALMANI, K., et al. Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 51, n. 3, p. 719-725, 2011.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, London, v. 357, n. Pt 3, p. 593-615, 2001.

ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Akron, v. 2012, p. 14,, 2012.

ALIMORADI, H., et al. The cardioprotective effects of an antiemetic drug, tropisetron, on cardiomyopathy related to doxorubicin. **Cardiovascular toxicology**, Totowa, v. 12, n. 4, p. 318-325, 2012.

ALMANCA, C. C., et al. Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. in mice. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 138, n. 2, p. 508-512, 2011.

¹ De acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP : documento eletrônico e impresso Parte I (ABNT)

- ALMEIDA, M. R., et al. Antigenotoxic effects of piquiá (*Caryocar villosum*) in multiple rat organs. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 67, n.2, p.171-177, 2012.
- ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology letters**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 57-83, 2004.
- AMARAL, C. L., et al. The effects of dietary supplementation of methionine on genomic stability and p53 gene promoter methylation in rats. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 722, n. 1, p. 78-83, 2011.
- ANAND, P., et al. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.
- ANANDAKUMAR, P. P., et al. Antioxidant DL-alpha lipoic acid as an attenuator of adriamycin induced hepatotoxicity in rat model. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 45, n. 12, p. 1045-1049, 2007.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M., et al. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guarana (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1817-1820, 2010.
- ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- ANTUNES, L. M. G.; 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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 419, n. 1-3, p. 137-143, 1998.
- _____. Olive oil protects against chromosomal aberrations induced by doxorubicin in Wistar rat bone marrow cells. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 2, p. 225-227, 1999a.
- _____. Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, New York, v. 19, n. 1, p. 53-59, 1999b.
- 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. Acesso: 10 de março de 2011.
- ARULMOZHI, V., et al. Antioxidant and antihyperlipidemic effect of *Solanum nigrum* fruit extract on the experimental model against chronic ethanol toxicity. **Pharmacognosy magazine**, Mumbai, v. 6, n. 21, p. 42-50, 2010.

- ASHLEY, N.; POULTON, J. Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. **Biochemical and biophysical research communications**, San Diego, v. 378, n. 3, p. 450-455, 2009.
- BARCELOS, G. R., et al. Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 85, n. 9, p. 1151-1157, 2011.
- BENTZ, M., et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes. **Journal of cellular biochemistry**, New York, v. 113, n. 7, p. 2256-2267, 2012.
- BERNI, A., et al. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in in vitro assays and in vivo. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 746, n. 1, p. 60-65, 2012.
- BERTHIAUME, J. M.; WALLACE, K. B. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. **Cell Biology and Toxicology**, Princeton, v. 23, n. 1, p. 15-25, 2007.
- BOHM, F.; EDGE, R.; TRUSCOTT, G. Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: Potential effects for human health. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 56, n. 2, p. 205-216, 2012.
- BONASSI, S., et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.
- BOWEN, D. E., et al. Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 722, n. 1, p. 7-19, 2011.
- BREINIG, M.; SCHIRMACHER, P.; KERN, M. A. Cyclooxygenase-2 (COX-2) - A therapeutic target in liver cancer? **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 13, n. 32, p. 3305-3315, 2007.
- BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BULUCU, F., et al. Efficacy of deferoxamine, N-acetylcysteine and selenium treatments in rats with Adriamycin-induced nephrotic syndrome. **Journal of nephrology**, Rome, v. 21, n. 4, p. 576-583, 2008.

- BURLINSON, B., et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 627, n. 1, p. 31-35, 2007.
- BUSTIN, S. A., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, Washington, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 51, p. 15-25, 2013.
- 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.
- CERELLA, C., et al. Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 80, n. 12, p. 1801-1815, 2010.
- CHACON, D. R., et al. Absence of genotoxic and antigenotoxic effects of a standardized extract of the medicinal plant *Solanum melongena* on peripheral blood and bone marrow cells of Wistar rats. **Cytologia**, Tokyo, v. 67, p. 417-422, 2002.
- CHEN, C.; KONG, A. N. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 318-326, 2005.
- CHLOPČIKOVA, S., et al. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. **Phytotherapy research : PTR**, Chichester, v. 18, n. 5, p. 408-413, 2004.
- CINKILIC, N., et al. Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 53C, p. 359-363, 2012.
- CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular aspects of medicine**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 446-467, 2010.
- CUSTER, L. L.; SWEDER, K. S. The Role of Genetic Toxicology in Drug Discovery and Optimization. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 9, n. 9, p. 978-985, 2008.
- 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 : a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry**, Basel, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.
- DAI, Z. J., et al. Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. **Cancer cell international**, London, v. 12, n. 1, p. 53, 2012.
- DALLE-DONNE, I., et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical chemistry**, Washington, v. 52, n. 4, p. 601-623, 2006.
- DE ANDRADE, M. C.; ANDRADE, J. S. Physicochemical changes in cubiu fruits (*Solanum sessiliflorum* Dunal) at different ripening stages. **Ciencia E Tecnologia De Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 250-254, 2012.
- DE AZEVEDO, B. M. N. M., et al. Antigenotoxicity of artemisinin C in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of applied toxicology : JAT**, Chichester, v. 31, n. 8, p. 714-719, 2011.
- DE KOK, T.M.; VAN BREDA, S.G.; MANSON, M.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 47, n. 2, p. 51-59, 2008.
- 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.
- DEAVALL, D.G., et al. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of toxicology*, Cairo, 2012.
- DHEDA, K., et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Biotechniques**, London, v. 37, n. 1, p. 112-+, 2004.
- DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 274, n. 2, p. 532-538, 1989.
- DILLIOGLUGIL, M. O., et al. Blood and tissue nitric oxide and malondialdehyde are prognostic indicators of localized prostate cancer. **International urology and nephrology**, Budapest, v. 44, n. 6, p. 1691-1696, 2012.
- DOS SANTOS, G. C., et al. Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 335-340, 2012.
- DOS SANTOS, R. A., et al. Protection of doxorubicin-induced DNA damage by sodium selenite and selenomethionine in Wistar rats. **Nutrition Research**, New York, v. 27, n. 6, p. 343-348, 2007.

- DOWD, N. P., et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates doxorubicin-mediated cardiac injury in vivo. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 108, n. 4, p. 585-590, 2001.
- DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, Swansea, v. 23, n. 3, p. 191-205, 2008.
- EL GHARRAS, H. Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. **International journal of food science & technology**, Osney Mead, v. 44, n. 12, p. 2512-2518, 2009.
- ELBERRY, A. A., et al. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 1178-1184, 2010.
- FARD, M. H., et al. Cardioprotective effect of whole fruit extract of pomegranate on doxorubicin-induced toxicity in rat. **Pharmaceutical biology**, London, v. 49, n. 4, p. 377-382, 2011.
- FARRELL JR, R. E. Chapter 6 - Quality Control for RNA Preparations. In: FARRELL JR, R. E. **RNA Methodologies**. San Diego: Academic Press, 2010.
- FENECH, M., et al. The HUMAN MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 428, n. 1-2, p. 271-283, 1999.
- FERREIRA, A. L., et al. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 631, n. 1, p. 26-35, 2007.
- FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular aspects of medicine**, Oxford, v. 27, n. 2-3, p. 126-139, 2006.
- FRAGA, C.G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 26, p. 235-244, 2005.
- FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 6, n. 7, p. 521-534, 2006.
- GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **The European journal of neuroscience**, Paris, v. 20, n. 11, p. 2783-2802, 2008.
- GENE DATABASE. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene%3E>. Acesso em: 20 de novembro de 2010.

- GENOVESE, M. I., et al. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, New York, v. 14, n. 3, p. 207-214, 2008.
- 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.
- GILLERON, M., et al. NADPH oxidases participate to doxorubicin-induced cardiac myocyte apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, San Diego, v. 388, n. 4, p. 727-731, 2009.
- GIUSTARINI, D., et al. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, Boca Raton, v. 46, n. 5-6, p. 241-281, 2009.
- GONTHIER, M. P., et al. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **The Journal of nutrition**, Rockville, v. 133, n. 6, p. 1853-1859, 2003.
- GORDON, M. H. Significance of Dietary Antioxidants for Health. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 1, p. 173-179, 2012.
- 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.
- JAESCHKE, H. Toxic responses of the liver. In: GREGUS, Z.; KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's. Toxicology: The Basic Science of Poisons**. New York: McGraw-Hill, 2001. p 557-582.
- GULCIN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, Limerick, v. 217, n. 2-3, p. 213-220, 2006.
- GUPTA, R. K., et al. Hepatoprotective effect of Solanum xanthocarpum fruit extract against CCl(4) induced acute liver toxicity in experimental animals. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Heidelberg, v. 4, n. 12, p. 964-968, 2011.
- HALL, E. D.; WANG, J. A.; MILLER, D. M. Relationship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury. **Experimental neurology**, Orlando, v. 238, n. 2, p. 176-182, 2012.
- HARIKUMAR, K. B.; AGGARWAL, B. B. Resveratrol - A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 7, n. 8, p. 1020-1035, 2008.
- HARPER, K. A.; TYSON-CAPPER, A. J. Complexity of COX-2 gene regulation. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 36, p. 543-545, 2008.

HARRIS, R. E. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. **Inflammopharmacology**, Dordrecht, v. 17, n. 2, p. 55-67, 2009.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical biochemistry**, New York, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

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. In vivo erythrocyte micronucleus assay - III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 627, n. 1, p. 10-30, 2007.

HAYASHI, M., et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research Letters**, Amsterdam v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. An Application of Acridine-Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. **Mutation Research Letters**, Amsterdam, v. 120, n. 4, p. 241-247, 1983.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; MORITA, T. Simulation Study of the Effects of Multiple Treatments in the Mouse Bone-Marrow Micronucleus Test. **Mutation research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 252, n. 3, p. 281-287, 1991.

HEDDLE, J. A., et al. Reflections on the development of micronucleus assays. **Mutagenesis**, Swansea, v. 26, n. 1, p. 3-10, 2011.

HENNING, S. M.; SWENDSEID, M. E.; COULSON, W. F. Male rats fed methyl- and folate-deficient diets with or without niacin develop hepatic carcinomas associated with decreased tissue NAD concentrations and altered poly(ADP-ribose) polymerase activity. **The Journal of nutrition**, Rockville, v. 127, n. 1, p. 30-36, 1997.

HOLTHOFF, J. H., et al. Resveratrol, a dietary polyphenolic phytoalexin, is a functional scavenger of peroxynitrite. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 80, n. 8, p. 1260-1265, 2010.

HU, R., et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC molecular biology**, London, v. 10, p. 93, 2009.

HUBER, R.; STRENG, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mutation research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 185-193, 1983.

International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use, 2011. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf. Acesso em: 10 de abril de 2012.

IWASAKI, Y., et al. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, Amsterdam, v. 877, n. 28, p. 3309-3317, 2009.

JAIME, P. C., et al. Factors associated with fruit and vegetable consumption in Brazil, 2006. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 43 Supl 2, p. 57-64, 2009.

JANSSENS, S.; TSCHOPP, J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappa B response. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 13, n. 5, p. 773-784, 2006.

JOMOVA, K., et al. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. **Journal of Applied Toxicology: JAT**, Chichester, v.31, p. 95–107, 2011.

KALENDER, Y.; YEL, M.; KALENDER, S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats - The effects of vitamin E and catechin. **Toxicology**, Amsterdam, v. 209, n. 1, p. 39-45, 2005.

KHOO, H. E., et al. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. **Molecules : a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry**, Basel, v. 16, n. 2, p. 1710-1738, 2011.

KIM, J. W., et al. Gene expression of cyclooxygenase in the aging heart. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, Washington, v. 56, n. 8, p. 350-355, 2001.

KIM, Y. A., et al. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells. **International journal of molecular medicine**, Athens, v. 17, n. 6, p. 1069-1075, 2006.

KIST, B. B., et al. In: **Anuário Brasileiro da Fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2012.

KNASMUELLER, S., et al. The need for proper chemical characterization of test substances in papers submitted to Food and Chemical Toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50(8), p. 2589-2590, 2012.

- KONOREV, E. A.; VANAMALA, S.; KALYANARAMAN, B. Differences in doxorubicin-induced apoptotic signaling in adult and immature cardiomyocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 45, n. 12, p. 1723-1728, 2008.
- KRISHNA, G.; URDA, G.; PAULISSEN, J. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. **Mutation research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam v. 453, n. 1, p. 45-50, 2000.
- KRYSTON, T. B., et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.
- KUMARAVEL, T. S., et al. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**, Princeton, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2009.
- LAFAY, S., et al. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. **The British journal of nutrition**, Wallingford, v. 96, n. 1, p. 39-46, 2006.
- LARQUE, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. **Nutrition**, Tarrytown, v. 23, n. 1, p. 87-95, 2007.
- LI, J., et al. Ameliorative effect of grape seed proanthocyanidin extract on thioacetamide-induced mouse hepatic fibrosis. **Toxicology letters**, Amsterdam, v. 213, n. 3, p. 353-360, 2012.
- LI, W., et al. Procyanidins Produce Significant Attenuation of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via Suppression of Oxidative Stress. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 192-197, 2009.
- LIANG, L., et al. TAK1 ubiquitination regulates doxorubicin-induced NF-kappaB activation. **Cell Signal**, v. 25, n. 1, p. 247-254, 2013.
- LIMON-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.
- LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American journal of clinical nutrition**, Bethesda, v. 78, n. 3 Suppl, p. 517S-520S, 2003.
- _____. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. **The Journal of nutrition**, Rockville, v. 134, n. 12, p. 3479s-3485s, 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods**, Duluth, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

- LIZCANO, L. J., et al. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, n. 4, p. 1566-1570, 2010.
- LOBO, V., et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.
- LONGO-SORBELLO, G. S. A., et al. Cytotoxicity and cell growth assays. In: CELIS, J.E., et al. **Cell Biology: a Laboratory Handbook**. San Diego: Academic Press, 2006.
- LOVELL, D. P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, Swansea, v. 23, n. 3, p. 171-182, 2008.
- LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular aspects of medicine**, Oxford, v. 30, n. 1-2, p. 42-59, 2009.
- MACGREGOR, J. T., et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation research**, Amsterdam, v. 189, n. 2, p. 103-112, 1987.
- MAIANI, G., et al. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 53 Suppl 2, p. S194-218, 2009.
- MALTA, L. G., et al. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, Ottawa, v. 49, n. 1, p. 604-611, 2012.
- 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.
- MANTOVANI, A., et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, London, v. 454, n. 7203, p. 436-444, 2008.
- MARTINS, R. A., et al. Exercise preconditioning modulates genotoxicity induced by doxorubicin in multiple organs of rats. **Cell Biochemistry and Function**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 293-296, 2012.
- MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. Chemical composition of the fruit of *Solanum sessiliflorum*. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A, Food research and technology**, Berlin, v. 206, n. 5, p. 364-366, 1998.
- MAVOURNIN, K. H., et al. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 239, n. 1, p. 29-80, 1990.

MCNAUGHTON, L., et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 26, p. 17161-17166, 2002.

MELENDEZ-MARTINEZ, A. J. et al. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, English, v. 101, n. 3, p. 1145-1150, 2007.

MENDONÇA, L. M., et al. Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. **Human & Experimental Toxicology**, Houndmills, v. 29, n. 8, p. 635-643, 2010.

MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 4, p. 956-963, 2008.

MOHAN, M., et al. Protective effect of *Solanum torvum* on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 436-440, 2010.

MONDINI, L., et al. Fruit and vegetable intake by adults in Ribeirao Preto, Southeastern Brazil. **Revista de saude publica**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 686-694, 2010.

MONOSTORI, P., et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, Amsterdam, v. 877, n. 28, p. 3331-3346, 2009.

MOREIRA, L.; CASTELLS, A. Cyclooxygenase as a Target for Colorectal Cancer Chemoprevention. **Current Drug Targets**, Hilversum, v. 12, n. 13, p. 1888-1894, 2011.

MORITA, T.; MACGREGOR, J. T.; HAYASHI, M. Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. **Mutagenesis**, Swansea, v. 26, n. 1, p. 223-230, 2011.

MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 4 (4), p. 315-322, 2003.

NAGAOKA, M. R., et al. Differential response related to genotoxicity in multiple organs of cirrhotic rats. **Hepatology International**, New York, v. 5, n. 2, p. 740-746, 2011.

NAMITHA, K. K.; NEGI, P. S. Chemistry and biotechnology of carotenoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 50, n. 8, p. 728-760, 2010.

- NERI-NUMA, I. A., et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, Ottawa, v. 50, n. 1, p. 70-76, 2013.
- NETO, M. D. B. M., et al. Antigenotoxicity of artemisin C in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of applied toxicology : JAT**, Chichester, v. 31, n. 8, p. 714-719, 2011.
- NIKI, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? **Febs Letters**, Amsterdam, v. 586, n. 21, p. 3767-3770, 2012.
- NOTARBARTOLO, M., et al. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. **Cancer Letters**, Limerick, v. 224, n. 1, p. 53-65, 2005.
- NUNES, R. D. 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.
- OECD. Organization for Economic Co-operation and Development (1997). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Guideline for the Testing of Chemicals. Updated Test Guideline 474. Disponível em: <http://www.oecd.org//ehs/test/health.htm>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2012.
- OHTA, T.; TAKAHASHI, M.; OCHIAI, A. Increased protein expression of both inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in human colon cancers. **Cancer Letters**, Limerick, v. 239, n. 2, p. 246-253, 2006.
- ORTEGA, R. M. Importance of functional foods in the Mediterranean diet. **Public Health Nutrition**, Wallingford, v. 9, n. 8A, p. 1136-1140, 2006.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian-Cells. **Biochemical and biophysical research communications**, San Diego, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.
- OZ, E.; ILHAN, M. N. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 286, n. 1-2, p. 11-15, 2006.
- PAHLEN, A. V. D. Cocona (*Solanum tojiro* Humbl. & Bonpl.), un fruto del Amazonas. **La cosecha Amazónica**, [S.l.], v. 7, p. 301-107, 1977.
- PALMIERI, B.; SBLENDORIO, V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use - Part I. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome v. 11, n. 5, p. 309-342, 2007.

- PARK, C. S., et al. Differential and constitutive expression of neuronal, inducible, and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, Orlando, v. 4, n. 5, p. 459-471, 2000.
- PARKIN, D. M.; KHLAT, M. Studies of cancer in migrants: rationale and methodology. **European journal of cancer**, Oxford, v. 32A, n. 5, p. 761-771, 1996.
- PASTORE, A., et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, Amsterdam, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.
- PATEL, N. J., C.; CORCORAN, G.B.; RAY, S.D. 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.
- PAUL, R.; KULKARNI, P.; GANESH, N. Avocado fruit (*Persea americana* Mill) exhibits chemo-protective potentiality against cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocyte culture. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, London v. 9, n. 3, p. 221-230, 2011.
- PAUTZ, A., et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, Orlando, v. 23, n. 2, p. 75-93, 2010.
- 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.
- PHILIP, M.; ROWLEY, D. A.; SCHREIBER, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. **Seminars in cancer biology**, London, v. 14, n. 6, p. 433-439, 2004.
- PHILLIPSON, M., et al. Inducible nitric oxide synthase is involved in acid-induced gastric hyperemia in rats and mice. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, Bethesda, v. 285, n. 1, p. G154-G162, 2003.
- PRAHALATHAN, C., et al. Salubrious effects of lipoic acid against adriamycin-induced clastogenesis and apoptosis in Wistar rat bone marrow cells. **Toxicology**, Amsterdam, v. 222, n. 3, p. 225-232, 2006.
- PRESTON, R. J. Epigenetic processes and cancer risk assessment. **Mutation research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 616, n. 1-2, p. 7-10, 2007.
- PRAKOBWONG, S., et al. Curcumin decreases cholangiocarcinogenesis in hamsters by suppressing inflammation-mediated molecular events related to multistep carcinogenesis. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, New York, v. 129, n. 1, p.88-100, 2010.

- RADONIC, A., et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and biophysical research communications**, San Diego, v. 313, n. 4, p. 856-862, 2004.
- RAHMAN, M., et al. Inhibition of COX-2 in colon cancer modulates tumor growth and MDR-1 expression to enhance tumor regression in therapy-refractory cancers in vivo. **Neoplasia**, v. 14, n. 7, p. 624-633, 2012.
- RASHIKH, A., et al. Protective effects of aliskiren in doxorubicin-induced acute cardiomyopathy in rats. **Human & Experimental Toxicology**, Houndmills, v. 30, n. 2, p. 102-109, 2011.
- RAYMAEKERS, M., et al. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. **Journal of clinical laboratory analysis**, Hoboken, v. 23, n. 3, p. 145-151, 2009.
- REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, new York, v. 51, n. 7, p. 1302-1319, 2011.
- REES, D. D.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 9, p. 3375-3378, 1989.
- 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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 695, n. 1-2, p. 22-28, 2010.
- RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea in vivo. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. Ulbra, 2003. p.173-200.
- RODDICK, J. G. The Acetylcholinesterase-Inhibitory Activity of Steroidal Glycoalkaloids and Their Aglycones. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, n. 10, p. 2631-2634, 1989.
- RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L.R.B; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacity against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, 2013. In press.
- 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.
- ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 50, p. S29-S34, 2009.

- RUBAN, A. V.; JOHNSON, M. P. Xanthophylls as modulators of membrane protein function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 504, n. 1, p. 78-85, 2010.
- SABIR, S. M.; ROCHA, J. B. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false "Jurubeba") against paracetamol-induced liver damage in mice. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 120, n. 2, p. 226-232, 2008.
- SALAS-SALVADO, J., et al. The role of diet in the prevention of type 2 diabetes. **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases**, Heidelberg, v. 21, p. 32-48, 2011.
- SALICK, J. Cocona (*Solanum sessiliflorum*) production and breeding potentials of the peach tomato In: WICKENS, G.E; HAQ, N.; DAY, P. **New crops for food and industry**. London: Chapman and Hall., 1989. p. 257-264.
- SANTOS, R. A.; TAKAHASHI, C. S. Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage in vitro in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 671-677, 2008.
- SATO, Y., et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, v. 403, n. 1-2, p. 136-138, 2011.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation research**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature protocols**, London, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.
- SCHWARZ, A., et al. Rats exposed to *Solanum lycocarpum* fruit in utero and during lactation: Neurochemical, behavioral and histopathological effects. **Neurotoxicology and Teratology**, New York, v. 27, n. 6, p. 861-870, 2005.
- 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.
- SERPELONI, J. M., et al. Dietary carotenoid lutein protects against DNA damage and alterations of the redox status induced by cisplatin in human derived HepG2 cells. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 288-294, 2012.
- SERPELONI, J. M., et al. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an in vitro analysis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Jena, v. 63, n. 5, p. 499-504, 2011a.

- SERPELONI, J. M., et al. An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antigenotoxic effects of chlorophyll b in mice. **Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 725, n. 1-2, p. 50-56, 2011b.
- 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.
- SHI, H. Y., et al. Chlorogenic acid against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 623, n. 1-3, p. 119-124, 2009.
- SHIMOYAMA, A. T., et al. Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie**, Berlin, v. 386, n. 1, p. 5-14, 2013.
- SIES, H. Strategies of Antioxidant Defense. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamin-E and Vitamin-C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids as Antioxidants. **The American journal of clinical nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 6, p. S1315-S1321, 1995.
- SILVA FILHO, D. F. **Cocona (Solanum sessiliflorum Dunal): Cultivo y utilizacion**. Caracas: Secretaria Pro-Tempore, 1998. 105 p.
- SIMÕES, C. M. O., et al. In: **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora UFRGS, 2004.
- 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**, Orlando, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- SMITH, S. H., et al. Antimutagenic activity of berry extracts. **Journal of medicinal food**, Larchmont, v. 7, n. 4, p. 450-455, 2004.
- SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 69, p. 145-182, 2000.
- SOARES-MOTA, M. R., et al. Toxicological evaluation of 10% Solanum lycocarpum St. Hill fruit consumption in the diet of growing rats: Hematological, biochemical and histopathological effects. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Jena, v. 62, n. 5, p. 549-553, 2010.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**, Swansea, v. 10, n. 6, p. 555-559, 1995.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1740, n. 2, p. 101-107, 2005.

SURH, Y. J.; KUNDU, J. K. Cancer preventive phytochemicals as speed breakers in inflammatory signaling involved in aberrant COX-2 expression. **Current Cancer Drug Targets**, Hilversum, v. 7, n. 5, p. 447-458, 2007.

SWIFT, L. P., et al. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. **Cancer Research**, Hauppauge, v. 66, n. 9, p. 4863-4871, 2006.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. **Progress in Cardiovascular Diseases**, Philadelphia, v. 49, n. 5, p. 330-352, 2007.

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 of toxicology**, Berlin, v. 82, n. 11, p. 869-873, 2008.

TANABE, T.; TOHNAI, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, New York, v. 68-9, p. 95-114, 2002.

TANG, K., et al. Niacin deficiency causes oxidative stress in rat bone marrow cells but not through decreased NADPH or glutathione status. **The Journal of nutritional biochemistry**, New York, v. 19, n. 11, p. 746-753, 2008.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & pharmacotherapy**, Paris, v. 58, n. 2, p. 100-110, 2004.

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 Medica**, Stuttgart, v. 77, n. 13, p. 1489-1494, 2011.

TEMPLE, N. J.; GLADWIN, K. K. Fruit, vegetables, and the prevention of cancer: Research challenges. **Nutrition**, Burbank, v. 19, n. 5, p. 467-470, 2003.

THELLIN, O., et al. A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection. **Biotechnology advances**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 323-333, 2009.

THOMAS, P., et al. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. **Mutagenesis**, Swansea, v. 26, n. 1, p. 69-76, 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.
- TITENKO-HOLLAND, N., et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. **Mutation research**, Amsterdam, v. 388, n. 1, p. 85-95, 1997.
- TONG, Z., et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. **BMC molecular biology**, London, v. 10, p. 71, 2009.
- 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.
- TURNER, N. D., et al. Quercetin Suppresses Early Colon Carcinogenesis Partly through Inhibition of Inflammatory Mediators. **Acta horticulturae**, The Hague, v. 841, p. 237-242, 2009.
- VALKO, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, Exeter, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VALKO, M., et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.
- VAN DER MOST, R. G., et al. Antitumor efficacy of the novel chemotherapeutic agent coramsine is potentiated by cotreatment with CpG-containing oligodeoxynucleotides. **Journal of immunotherapy**, Hagerstown, v. 29, n. 2, p. 134-142, 2006.
- 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.
- WALLACE, H. M. The polyamines: past, present and future. **Essays in biochemistry**, London, v. 46, p. 1-9, 2009.
- WANG, D.; DUBOIS, R. N. Prostaglandins and cancer. **Gut**, London, v. 55, n. 1, p. 115-122, 2006.
- _____. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 29, n. 6, p. 781-788, 2010.
- WATERS, M. D., et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation research**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990.
- 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.

- WOUTERSEN, R. A., et al. Safety evaluation of synthetic beta-carotene. **Critical reviews in toxicology**, London, v. 29, n. 6, p. 515-542, 1999.
- WU, A. H., et al. Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. **British Journal of Cancer**, London, v. 98, n. 1, p. 9-14, 2008.
- XIN, Y. F., et al. Alleviation of the acute doxorubicin-induced cardiotoxicity by Lycium barbarum polysaccharides through the suppression of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford v. 49, n. 1, p. 259-264, 2011.
- YEN, G. C.; CHEN, H. Y.; PENG, H. H. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 39, n. 11, p. 1045-1053, 2001.
- YUYAMA, L. K. O., et al. Quantificação de macro e micro nutrientes em algumas etnovarietades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 37, n. 3, p. 425-430, 2007.
- YUYAMA, L. K. O., et al. Estudo da influência do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) sobre a concentração sérica de glicose. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 232-236, 2005.
- ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? **Mutation research**, Amsterdam, v. 626, n. 1-2, p. 1-3, 2007.
- ZHANG, Y. W., et al. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, Warszawa, v. 57, n. 6, p. 435-445, 2009.
- ZHENG, J. L., et al. DNA degradation in nucleolus of skeletal muscle, heart, liver, kidney and brain in mice after death. **Journal of Forensic Medicine**, Shanghai, v. 26, n. 3, p. 161-164, 2010.
- ZHU, W. Q., et al. A Mouse Model for Juvenile Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction. **Pediatric Research**, Basel, v. 64, n. 5, p. 488-494, 2008.

ANEXO

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.250.53.0), intitulado "Avaliação da Citotoxicidade, Genotoxicidade, Antigenotoxicidade e Expressão dos Genes iNOS e COX-2 em Ratos Tratados com a Polpa do Fruto de *Solanum sessiliflorum* Dunal", de autoria de **Livia Cristina Hernandez** e de **Lusânia Maria Greggí Antunes**, 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 em reunião da CEUA de 05/07/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.250.53.0), entitled: "Evaluation of Citotoxicity, Genotoxicity, Antigenotoxicity and Gene Expression of iNOS and COX-2 in Rats Treated with the Fruit Pulp of *Solanum sessiliflorum* Dunal", by **Livia Cristina Hernandez** and **Lusânia Maria Greggí Antunes**, 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 in the meeting, July 05, 2011.

Ribeirão Preto, 7 de julho de 2011.

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

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro