

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 Hernandes

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 Hernandes

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, Máira 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. 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. Foto Eliseu Rodrigues	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

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 Abreviaturas e Siglas	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	2
1.2 O antitumoral doxorrubicina	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 (COX-2)	11
2. CONCLUSÕES	16
3. REFERÊNCIAS	18
ANEXO	39

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 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 semeadura. 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 etnovariedades (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 cardiotoxícos, 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).

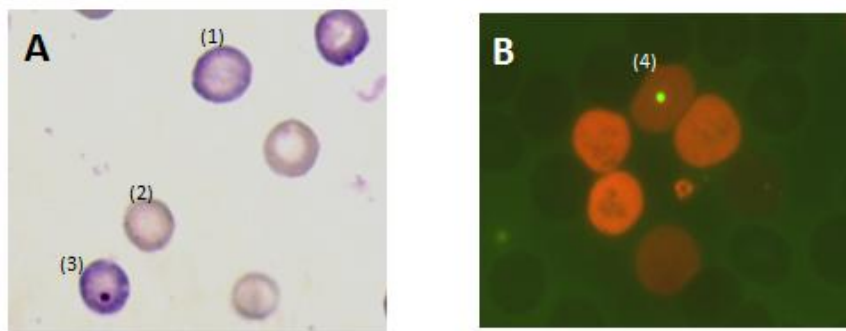


Figura 2. Fotomicrografias obtidas no teste do micronúcleo em células da medula óssea (A) e do sangue periférico (B) de ratos Wistar. Coloração Giemsa e Laranja de Acridina, respectivamente. Aumento original de 1000X. Fonte: Lívia Cristina Hernandes. Laboratório de Nutrigenômica - FCFRP/USP, 2011. Em (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).

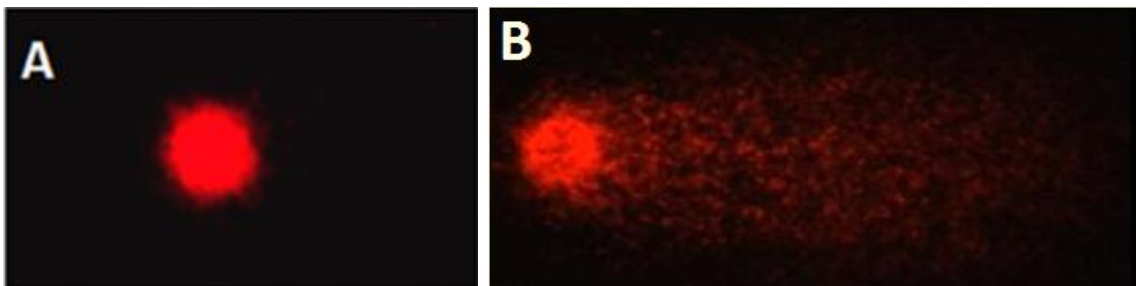


Figura 3. Fotomicrografias de nucleoides sem migração de DNA (A) e com migração formando cauda (B) obtidos de células do fígado de ratos Wistar na análise do ensaio cometa em microscópio de fluorescência. Coloração brometo de etídio. Aumento original de 400X. Fonte: Lívia Cristina Hernandes. Laboratório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

Vários estudos têm aplicado o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo na investigação dos efeitos antígenotóxicos 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-hidroxinonal 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 glutatona, 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 glutatona peroxidase e a glutatona S-transferase, a glutatona constitui-se uma importante defesa contra o estresse oxidativo (VALKO et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio podem conduzir à oxidação da glutatona reduzida (GSH) em glutatona 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 glutatona em fígado e coração.

1.5 Genes óxido nítrico sintase indutível (*iNos*) e ciclooxigenase-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 à 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* constataram 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.

Conclusões

2. 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 doxorubicina 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 doxorubicina;
- Protegeu o DNA dos danos induzidos pela doxorubicina 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 doxorubicina;
- Apresentou em sua composição os elementos-traço zinco, manganês, selênio, cobre, crômio determinados por ICP-MS, mas não em quantidades significativas.

Referências

3. 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/generaldo_cuments/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.

CHLOPCIKOVA, 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 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. 2,6, 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. 27, 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 Suppl 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 Ribeirão Preto, Southeastern Brazil. **Revista de saúde pública**, 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 artepillin 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 topiro* 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 Gregg 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 Gregg 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