

FLÁVIA APARECIDA RESENDE

**ESTUDO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E/ OU
ANTIMUTAGÊNICA DA *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA*
EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Dissertação apresentada à
Universidade de Franca,
como exigência parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Denise
Crispim Tavares

FRANCA
2008

FLÁVIA APARECIDA RESENDE

ESTUDO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E/ OU
ANTIMUTAGÊNICA DA *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA*
EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Presidente: _____

Nome:

Instituição:

Titular 1: _____

Nome:

Instituição:

Titular 2: _____

Nome:

Instituição:

Franca, ____/ ____/ ____

**Ao meu pai Ilton, meu primeiro
mestre, que para todo o sempre
permanecerá na minha memória**

Dedico...

AGRADECIMENTOS

À DEUS, meu grande companheiro.

À minha orientadora, Profa. Dra. Denise Crispim Tavares, pela dedicação, paciência e confiança, pela amizade e compreensão nos momentos difíceis e principalmente pelas oportunidades e imensa contribuição para o meu crescimento científico, moral e acadêmico.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Cunha, coordenador do curso de pós-graduação, pela dedicação ao curso e pelo acompanhamento em todos os nossos trabalhos, pela sua responsabilidade e sua preocupação, e principalmente por sua satisfação em cada trabalho concluído.

À secretária de pós-graduação em Ciências da Universidade de Franca, pela gentileza e dedicação com os pós-graduandos e docentes credenciados.

Às minhas colegas de trabalho e grandes amigas, Jacqueline Alves, Carla Munari e Juliana Senedese por terem dividido comigo essa tarefa e me ajudarem quando eu não podia estar presente.

Aos demais colegas do laboratório de Mutagênese e Citogenética da Universidade de Franca pelo companheirismo e bons momentos que passamos juntos.

Aos funcionários do biotério da Universidade de Franca.

Aos professores componentes da banca examinadora que gentilmente aceitaram o convite para avaliarem esta dissertação de Mestrado.

Aos meus colegas e professores da pós-graduação – Mestrado em Ciências, turma 2005, por todos momentos compartilhados.

À toda minha família que sempre me apoiou e especialmente à minha mãe Edina Soares Cunha Resende que se esforçou para me sustentar em Franca e que junto comigo viveu esse sonho e ao meu irmão Ilton Amélio Resende Junior por todo amor, carinho e atenção e também pelo companheirismo, apoio, incentivo e paciência de todas as horas.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

RESENDE, Flávia Aparecida. Estudo da atividade mutagênica e/ ou antimutagênica da *Baccharis dracunculifolia* em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Franca, Franca, SP.

A espécie *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), uma planta nativa do Brasil comumente conhecida como “alecrim do campo” e “vassoura”, é indicada como a mais importante origem botânica da própolis verde. Sabendo-se que ambas possuem constituição química semelhante, é relevante avaliar o possível efeito mutagênico e a influência do extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia* (EAE-Bd) sobre a frequência de danos cromossômicos induzidos pelo quimioterápico doxorrubicina (DXR) em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. Para isso, foram realizados experimentos utilizando células da medula óssea e do sangue periférico de ratos Wistar, onde foram analisados como parâmetros as frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e o índice de divisão nuclear (IDN). Culturas de células de ovário de hamster Chinês foram utilizadas como sistema-teste *in vitro* sendo analisados as frequências de aberrações cromossômicas (AC) e o índice mitótico (IM). As frequências de PCEMNs revelaram que nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais tratados com as diferentes concentrações de EAE-Bd (6; 12; 24 mg/kg p.c.) quando comparados com os animais dos grupos controles negativo e solvente, tanto em medula óssea como em sangue periférico, demonstrando ausência de efeito mutagênico da EAE-Bd nas doses usadas. Os resultados também mostraram uma redução significativa nas frequências de micronúcleos nos grupos tratados concomitantemente com as diferentes concentrações de EAE-Bd e DXR quando comparados àqueles tratados somente com DXR. Com relação aos valores de IDN obtidos tanto em medula óssea como em sangue periférico dos animais submetidos aos diversos tratamentos mostraram ausência de citotoxicidade. Os estudos *in vitro* mostraram que as culturas tratadas com as diferentes concentrações de EAE-Bd (12,5; 25 e 50 µg/mL) apresentaram frequências de AC semelhantes àquelas das culturas do controle negativo. Entretanto, na concentração de 100 µg/mL houve um aumento significativo na frequência de AC quando comparada às culturas não submetidas a qualquer tratamento. Os tratamentos de associação de EAE-Bd e DXR revelaram que as culturas tratadas com 12,5 µg/mL de EAE-Bd e DXR apresentaram uma redução significativa na frequência de AC quando comparadas às culturas tratadas somente com DXR. A análise do IM mostrou que não houve diferenças significativas entre as culturas tratadas com as diferentes concentrações de EAE-Bd e/ ou DXR e o controle negativo, mostrando ausência de citotoxicidade. Os constituintes da *B. dracunculifolia* responsáveis pelos efeitos mutagênicos e antimutagênicos observados no presente estudo são provavelmente flavonóides e fenilpropanóides, uma vez que essas substâncias podem agir tanto como pró-oxidantes como capturadores de radicais livres.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*; Própolis; Micronúcleos; Aberrações cromossômicas

ABSTRACT

RESENDE, Flávia Aparecida. *In vivo* and *in vitro* studies on the mutagenic and/or antimutagenic activity of *Baccharis dracunculifolia* in mammalian cells. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Franca, Franca, SP.

The plant *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), popularly known as “alecrim do campo” and “vassoura”, is native to Brazil. Because this plant is believed to be the most important botanical source of green propolis, it is extremely relevant to evaluate the possible mutagenic effect and the influence of the acetyl acetate extract from the leaves of *B. dracunculifolia* (EAE-Bd) on the frequency of the chromosomal damage induced by the chemotherapy drug doxorubicin (DXR) in mammalian cells both *in vivo* and *in vitro*. To this end, we carried out experiments on cells from the bone marrow and the peripheral blood of Wistar rats. Parameters such as the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) and the nuclear division index (NDI) were analyzed. Cell cultures from the Chinese hamster ovary were employed as test systems, and the frequency of chromosomal aberrations (CA) and the mitotic index (MI) were analyzed. The MNPCE frequencies revealed no significant difference between the animals treated with the EAE-Bd different concentrations (6; 12 and 24 mg/kg b.w.) compared to the negative and solvent controls groups, in the case of both the bone marrow and the peripheral blood, demonstrating the absence of EAE-Bd mutagenic effect in the above-mentioned dosages. Results also showed a significant reduction in the micronuclei frequency in the groups treated with EAE-Bd and DXR compared to those treated with DXR only. As for the NDI values obtained from the bone marrow and the peripheral blood of the animals submitted to the various treatments, they did not give evidence of any cytotoxicity. The *in vitro* studies demonstrated that the cultures treated with EAE-Bd different concentrations (12.5; 25 and 50 µg/mL) presented CA frequencies similar to those of the negative control. However, there was a significant increase in the CA frequency at the concentration of 100 µg/mL compared to the untreated cultures. Treatments with EAE-Bd and DXR revealed that cultures treated with 12.5 µg/mL EAE-Bd and DXR underwent a significant reduction in the CA frequency compared to the cultures treated with DXR only. The MI analysis showed that there were no significant differences between the cultures treated with different EAE-Bd concentrations and/ or DXR and the negative control, which accounts for lack of cytotoxicity. The components of *B. dracunculifolia* responsible for the mutagenic and antimutagenic effects observed in the present study are probably flavonoids and phenylpropanoids, since these compounds can act as pro-oxidants and free radical scavengers.

Keywords: *Baccharis dracunculifolia*; Propolis; Micronuclei; Chromosomal Aberration

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 12 |
| LISTA DE TABELAS | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 ANTIMUTAGÊNESE..... | 16 |
| 1.2 SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> : MICRONÚCLEOS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO..... | 19 |
| 1.3 SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> : CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS..... | 24 |
| 1.4 PRÓPOLIS E <i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i> | 28 |
| 2 OBJETIVOS | 34 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 34 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 34 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> | 35 |
| 3.2 AGENTE INDUTOR DE DANOS CROMOSSÔMICOS..... | 36 |
| 3.3 SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> : MICRONÚCLEOS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO..... | 37 |
| 3.3.1 ANIMAIS..... | 37 |
| 3.3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 37 |
| 3.3.3 TESTE DE MICRONÚCLEOS..... | 39 |
| 3.3.4 ANÁLISE DAS LÂMINAS..... | 40 |
| 3.4 SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> : CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS..... | 41 |
| 3.4.1 CULTIVO DAS CÉLULAS..... | 41 |
| 3.4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 42 |
| 3.4.3 TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS..... | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.4 ANÁLISE DAS LÂMINAS..... | 45 |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 46 |
| 4 RESULTADOS..... | 47 |
| 4.1 SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> : MICRONÚCLEOS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO..... | 47 |
| 4.2 SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> : CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS..... | 56 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 63 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 74 |
| 6.1 SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> : MICRONÚCLEOS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO..... | 74 |
| 6.2 SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> : CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS..... | 75 |
| 7 REFERÊNCIAS..... | 77 |
| ANEXO 1..... | 88 |
| ANEXO 2..... | 89 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – aberrações cromossômicas

ATV – solução de tripsina 0,2% + versene 0,2%

B2; B6; B12; C; E – vitaminas

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CHL – células de pulmão de hamster Chinês (*Chinese hamster lung*)

CHO – células de ovário de hamster Chinês (*Chinese hamster ovary*)

CHO K1; CHO-K5 – linhagens celulares de ovário de hamster Chinês

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

DP – desvio-padrão

DXR – doxorubicina

EAE-Bd – extrato em acetato de etila das folhas de *Baccharis dracunculifolia*

G₁; G₂ – fases do ciclo celular

IDN – índice de divisão nuclear

IM – índice mitótico

i.p. – intraperitoneal

HAM F10 + DEM – meio de cultura

HIV – vírus da imunodeficiência humana

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

MA – metáfase alterada

NCE – eritrócito normocromático

PBS – tampão fosfato (*phosphate buffer saline*)

P. C. – peso corpóreo

PCE – eritrócito policromático

PCEMNs – eritrócito policromático micronucleado

O_2^1 – oxigênio singlete

$(O_2^{\cdot-})$ - radical superóxido

$(\cdot OH)$ – radical hidroxil

ROS – espécie de oxigênio reativo (*reactive oxygen species*)

rpm – rotação por minuto

S9 – fração microsomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254

TK6 – linhagem celular de linfoblastos humanos

Trp-P-2 – 3-amino-1-metil-5-H-pirido-[4,3-b]-indol

v/v – volume por volume

V79 – linhagem celular de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1 – Fotomicrografia óptica de eritrócito policromático micronucleado (a); sem micronúcleo (b) e eritrócito normocromático sem micronúcleo (c) de medula óssea (Giemsa; aumento original, 1000x)..... | 23 |
| Figura 2 – Fotomicrografia óptica de eritrócito policromático micronucleado (a); sem micronúcleo (b) e eritrócito normocromático sem micronúcleo (c) de sangue periférico (Giemsa; aumento original, 1000x).... | 23 |
| Figura 3 – Fotomicrografias ópticas de células de ovário de hamster Chinês (CHO) (A) Metáfase normal; (B) Metáfase com figura trirradial (Giemsa; aumento original, 1000X)..... | 25 |
| Figura 4 – <i>Baccharis dracunculifolia</i> | 31 |
| Figura 5 - Análise utilizando CLAE do extrato de <i>B. dracunculifolia</i> . ácido cafeíco (1); ácido- <i>p</i> -cumárico (2); aromadendrina (3), drupanina (4), artepelin C (5) e baccharina (6)..... | 36 |
| Figura 6 – Comparação das freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) entre as células de medula óssea e sangue periférico (24 h e 48 h) de ratos Wistar tratados com diferentes doses de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles..... | 56 |
| Figura 7 – Freqüências médias de aberrações cromossômicas (AC) observadas em culturas de células de ovário de hamster Chinês submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de EAE-Bd e/ ou | |

DXR, e respectivos controles. Para cada tratamento foram analisadas 300
células metafásicas..... 62

LISTA DE TABELAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabela 1 – Grupos experimentais e protocolos dos tratamentos (<i>in vivo</i>).... | 38 |
| Tabela 2 – Grupos experimentais e protocolo dos tratamentos (<i>in vitro</i>)..... | 43 |
| Tabela 3 – Dados individuais das freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles..... | 50 |
| Tabela 4 – Dados individuais das freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em sangue periférico (24 h e 48 h) de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles..... | 52 |
| Tabela 5 – Freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles..... | 54 |
| Tabela 6 – Freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em sangue periférico (24 h e 48 h) de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles..... | 55 |
| Tabela 7 – Freqüências de aberrações cromossômicas (AC), metáfases alteradas (MA) e índices mitóticos (IM) observados em culturas de células de ovário de hamster Chinês submetidas ao tratamento com diferentes | |

concentrações de EAE-Bd e/ou DXR, e respectivos controles..... 58

Tabela 8 – Somatória das freqüências de aberrações cromossômicas (AC) e metáfases alteradas (MA) (incluindo gaps) observadas em culturas de células ovário de hamster Chinês submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de EAE-Bd e/ou DXR, e respectivos controles.... 60

Tabela 9 – Índice mitótico (IM), total e porcentagem das freqüências de aberrações cromossômicas (AC) (excluindo os gaps), e a porcentagem de redução das freqüências de aberrações observadas nas culturas de células de ovário de hamster Chinês tratadas com EAE-Bd e/ ou DXR, e seus respectivos controles..... 61

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTIMUTAGÊNESE

Em vista do contato contínuo do homem com agentes mutagênicos, é natural que o nosso organismo apresente mecanismos de defesa. Esses mecanismos incluem a inativação enzimática pela superóxido desmutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase; e não enzimática, por ação de micronutrientes, como as vitaminas C, E e beta-caroteno. Em conjunto, atuam na estabilização de espécies altamente reativas que danificam o DNA, mantendo a integridade funcional e estrutural das células [1, 2]. Entretanto, os mecanismos naturais de defesa acabam muitas vezes sendo intensamente desafiados, o que enfatiza a importância das investigações por compostos exógenos que possam evitar ou minimizar os danos induzidos no DNA [3].

Três décadas de pesquisas têm revelado que é mais fácil prevenir o câncer do que tratar, e que o consumo de certas frutas e vegetais podem reduzir o risco do câncer [4]. Acredita-se que muitos agentes na dieta suprimem a transformação, hiperproliferação e o processo que inicia a carcinogênese. Estes agentes podem ser classificados como quimiopreventivos desde que sua capacidade em impedir ou atrasar o início do processo da carcinogênese tenha sido estudada extensivamente [5]. A dieta pode ser um fator chave na determinação da estabilidade genômica e dessa maneira na prevenção de doenças humanas [6].

De acordo com De Flora e Ferguson [7] quimioprevenção é a administração de agentes farmacológicos adequados ou a ingestão de macronutrientes,

micronutrientes ou fitoquímicos não nutritivos que previnem a indução, inibem ou atrasam a progressão do câncer, ou induzem a reversão da carcinogênese até o estágio pré-maligno. Nesse sentido, há um aumento crescente no interesse sobre a quimioprevenção do câncer, e compostos antimutagênicos e antitumorais são cada vez mais procurados [8]. O termo antimutagênico foi usado originalmente por Novick e Szilard [9] para descrever os compostos que reduzem a frequência ou a taxa de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente dos mecanismos de proteção envolvidos. O termo anticarcinogênico também é usado para os agentes que reduzem ou inibem o desenvolvimento de tumores.

Os agentes antimutagênicos podem ser colocados em duas categorias gerais: aqueles que inibem a formação de lesões e são classificados como desmutagênicos, e aqueles que colaboram no reparo das lesões que já estão presentes no DNA, denominados bioantimutagênicos [10]. Os agentes desmutagênicos são compostos capazes de inativar química, física ou enzimaticamente um agente mutagênico. As inativações química e física ocorrem por ligação direta com o agente mutagênico, impedindo sua ativação por seqüestro ou adsorção de agentes mutagênicos e radicais livres, impossibilitando que os mesmos estabeleçam contato com o material genético. A inativação enzimática de um mutágeno pode ocorrer por dois mecanismos: a inativação por enzimas de fase I da biotransformação, como as enzimas da família P450, ou a indução de enzimas de fase II, como a glutathione S-transferase. Já os compostos bioantimutagênicos podem atuar como moduladores do reparo e replicação do DNA, agindo em nível celular ao aumentar a fidelidade na replicação do material

genético, estimular o reparo livre de erros de danos no material genético ou inibir os sistemas de reparo sujeitos a erro [11, 12].

Uma classificação de pontos de intervenção nos quais é possível prevenir a mutação e o câncer é proposta por De Flora et al. [13]. Esta classificação incluiu uma variedade de mecanismos extracelulares e celulares, desde a iniciação até estágios posteriores da carcinogênese, ou seja, promoção, progressão, invasão e metástase. Entre os processos extracelulares, pode-se citar os físicos, como a remoção mecânica dos agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos, e os químicos, tais como a modificação da microbiota intestinal, complexação, diluição e desativação de mutágenos e carcinógenos endógenos e exógenos [14 – 16]. Os processos celulares compreendem a inibição de mutação e da iniciação do câncer, dos quais se pode citar: modificação do transporte transmembrana; modulação do metabolismo; atividade antioxidante; controle da replicação celular; modulação dos mecanismos de reparo do DNA; controle da expressão gênica e neutralização dos produtos oncogênicos [14, 17].

Existem também os mecanismos de anticarcinogênese que envolvem a inibição da promoção e da progressão tumoral, bem como bloqueio de metástases. Estes mecanismos envolvem, basicamente, a ação de antioxidantes, bloqueio da angiogênese e atividades hormonais [14, 17].

Os agentes quimiopreventivos podem ser usados não somente para prevenir o câncer, mas também na terapêutica, pois muitos deles podem ser usados em combinação com agentes quimioterápicos para intensificar o efeito com o uso de menores doses e assim minimizar a toxicidade induzida pelos quimioterápicos [5].

Entretanto, a utilização de agentes protetores só é possível com base na análise cuidadosa da avaliação segura do risco-benefício após vários modelos experimentais em uma variedade de testes *in vitro*, *in vivo* e clínicos [18], além de ser fundamental estabelecer o mecanismo de ação inibidora [19].

1.2 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*: MICRONÚCLEOS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO

De acordo com Grawe [20] o teste de micronúcleos em células de medula óssea e sangue periférico é recomendado para a identificação de agentes capazes de induzir ou prevenir danos cromossômicos, e dessa maneira ser usado em ensaios de mutagenicidade e antimutagenicidade. O procedimento original para o teste de micronúcleo foi desenvolvido por Schmid [21], subseqüentemente modificado por Heddle e Salamone [22].

Segundo Von Lebedur e Schmid [23] um ou diversos núcleos secundários formados são, como regra, muito menores que o núcleo principal da célula e, por isso, são denominados de micronúcleos. Estes são corpúsculos de cromatina originados da perda de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos acêntricos que não foram incorporados no núcleo das células-filha durante a mitose [24]. Heddle e Carraro [25] mediram o conteúdo de DNA de micronúcleos induzidos por radiação gama na medula óssea de camundongos e mostraram que esse conteúdo variou de 0,5 a 1,1% do núcleo diplóide em G₁, com uma média de 3,5 %. Tais resultados estão de acordo com o esperado, considerando a hipótese

de que os micronúcleos surgem de fragmentos acêntricos produzidos por quebra ao acaso dos cromossomos da célula.

Entretanto, recentemente Cammerer et al. [26] relataram que uma das principais vantagens do teste de micronúcleo é justamente a capacidade de avaliar o potencial clastogênico e aneugênico de compostos usando amostras *in vivo* e *in vitro*. Os compostos aneugênicos e clastogênicos têm diferentes mecanismos de ação. A aneuploidia é induzida pela interação com tubulina e inibição do processo de polimerização necessário para a formação do fuso mitótico, o que leva a perda de cromossomos inteiros. Já os compostos clastogênicos causam quebras cromossômicas, resultando na perda de fragmentos cromossômicos. Acredita-se que o tamanho do micronúcleo é um parâmetro para distinguir danos causados por compostos aneugênicos (micronúcleos grandes) de compostos clastogênicos (micronúcleos pequenos) [27]. Sendo assim, Cammerer et al. [26], através de uma avaliação em citometria de fluxo do sangue periférico de ratos Wistar, mostraram a possibilidade de diferenciar, após tratamentos múltiplos, micronúcleos induzidos por compostos aneugênicos daqueles provocados por compostos clastogênicos.

A análise da frequência de micronúcleos pode ser obtida em diferentes órgãos como a medula óssea (Fig. 1) [28], fígado [29], rim [30], e sangue periférico (Fig. 2) [31]. A maioria de micronúcleos presentes em células da medula óssea e sangue periférico apropriadas para análises são denominadas eritrócitos jovens. Poucas horas após o término das mitoses, os eritroblastos, expõem seus núcleos, por isso, o micronúcleo fica remanescente no citoplasma dos eritrócitos jovens e é facilmente reconhecido. Os eritrócitos jovens se coram diferentemente das outras

células. Durante a sua formação, aproximadamente 24 h, são denominados eritrócitos policromáticos (PCE) anucleados [21]. Estes eritrócitos têm um tempo de vida relativamente curto, sendo a análise do micronúcleo restrita a esse tipo de célula, sabendo-se que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente sob a influência do agente mutagênico, sendo a frequência de micronúcleo induzida em PCE dependente do tempo de amostragem [21, 32].

A porcentagem de PCE entre o total de eritrócitos (PCE + NCE [normocromático]) deve ser determinada a fim de se avaliar a citotoxicidade. A toxicidade é indicada por uma redução significativa na porcentagem de PCE, e é obtida pela análise de pelo menos 200 eritrócitos por animal, para pelo menos 5 animais por grupo de tratamento [33].

É obrigatório incluir um grupo controle positivo em todo experimento para assegurar que o teste está sendo realizado de acordo com os padrões estabelecidos. Uma indução significativa de eritrócitos policromáticos micronucleados (PEMNs) deve ser observada nos animais do controle positivo, para que o resultado negativo do teste de micronúcleo possa ser aceito [33].

Dentre as vantagens do teste de micronúcleo *in vivo* está a possibilidade de se utilizar qualquer tipo de roedor, permitir tratamentos subagudos e crônicos, sendo possível a contagem dos eritrócitos maduros, mesmo após o tratamento crônico em ratos [34], além de poder ser usado também em humanos [35]. Destaca-se, ainda, a possibilidade de utilização de várias formas de administração, dentre as quais, pode-se citar subcutânea e gavagem [32].

O teste de micronúcleo é tecnicamente mais simples que o teste de aberrações cromossômicas (AC), sendo um teste mais rápido na preparação e na análise das lâminas, tem um resultado menos subjetivo, detecta agentes clastogênicos e aneugênicos, requer menor número de animais e pode ser automatizado para análise de imagem e citometria de fluxo. Assim, é um teste muito apropriado para ser usado na rotina toxicológica, amplamente adequado para detectar a mutagenicidade de compostos [33].

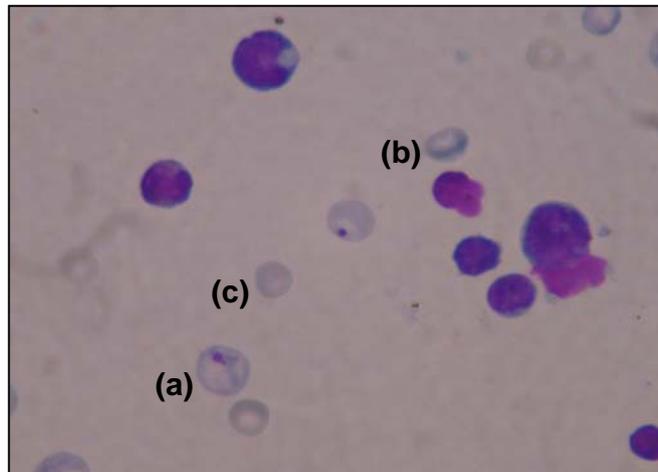


Figura 1 - Fotomicrografia óptica de eritrócito policromático micronucleado (a); sem micronúcleo (b) e eritrócito normocromático sem micronúcleo (c) de medula óssea (Giemsa; aumento original, 1000x)

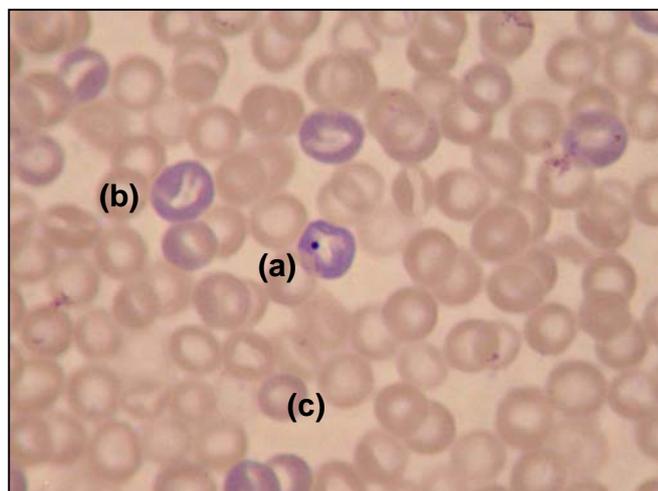


Figura 2 - Fotomicrografia óptica de eritrócito policromático micronucleado (a); sem micronúcleo (b) e eritrócito normocromático sem micronúcleo (c) de sangue periférico (Giemsa; aumento original, 1000x)

1.3 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*: CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS

A evolução das estratégias e métodos para a identificação de agentes mutagênicos é muito discutida [36]. Testes referentes à genética toxicológica são um componente básico para a avaliação da segurança pré-clínica de compostos candidatos à drogas, tendo como propósito identificar substâncias que possuem um risco potencial de induzir mutações e carcinogenicidade. A literatura mostra que um único sistema-teste não é capaz de detectar todos os tipos de efeitos genotóxicos. Sendo assim, o potencial de uma substância causar genotoxicidade é tipicamente determinado por uma bateria de testes *in vivo* e *in vitro* [37].

Os sistemas-testes de curta duração são amplamente utilizados na detecção de agentes mutagênicos e antimutagênicos ambientais [12]. Entre esses sistemas, destaca-se a cultura de células de mamíferos *in vitro*, como a cultura de linfócitos de sangue periférico humano e as linhagens celulares provenientes de hamster Chinês, como por exemplo, as células de ovário (CHO, *chinese hamster ovary*; Fig. 3) e células V79 (fibroblastos de pulmão) [38]. As células que se aderem e se dividem em superfície sólida são mais indicadas para experimentos de mutagenicidade *in vitro*, pois permitem experimentos com tratamentos nas diferentes fases do ciclo celular [39] e facilitam a manipulação durante a realização de estudos em condições de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento em relação ao agente mutagênico [12].

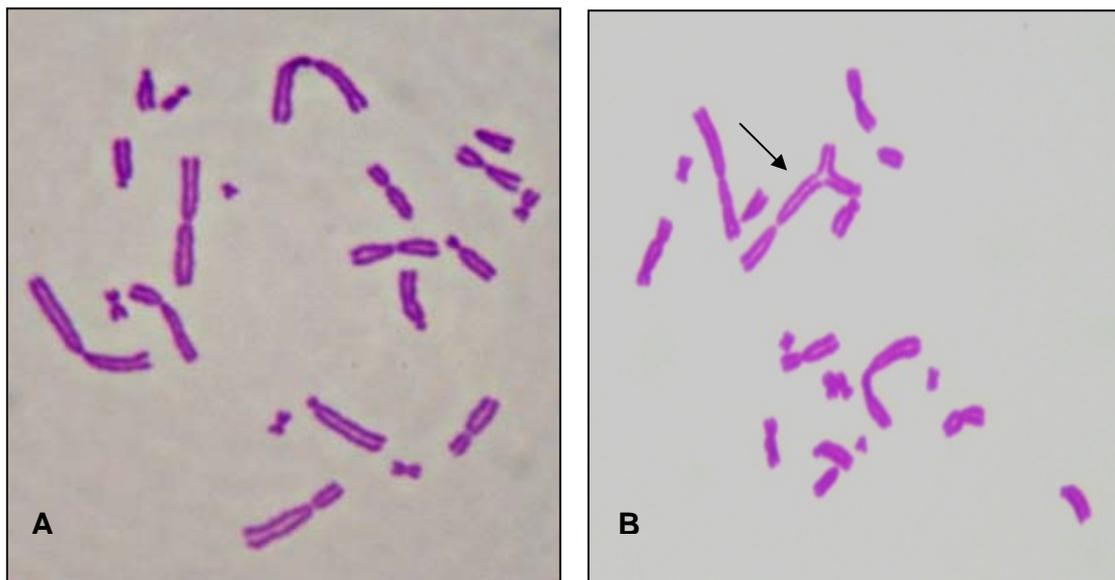


Figura 3 – Fotomicrografias ópticas de células de ovário de hamster Chinês (CHO) (A) Metáfase normal; (B) Metáfase com figura trirradial (Giemsa; aumento original, 1000x)

O teste de AC usando cultura de células é um dos métodos mais sensíveis para a detecção de substâncias mutagênicas e/ ou carcinogênicas [40], sendo reconhecido internacionalmente [41]. As AC são alterações resultantes de uma quebra ou de uma troca de material genético, podendo ser classificadas em numéricas ou estruturais [42].

As AC numéricas originam-se pela ação de agentes aneugênicos, os quais interferem nas fibras do fuso mitótico, gerando uma segregação errada dos cromossomos durante a anáfase e originando perda ou ganho de cromossomos inteiros. Já as AC estruturais são alterações na estrutura cromossômica, visíveis microscopicamente, que envolvem quebras do cromossomo, seguidas por rearranjo anormal do cromossomo quebrado. A quebra pode ser completa em uma única cromátide ou em ambas, resultando na perda ou deleção de parte do

material genético, translocação ou outro rearranjo. Os agentes capazes de gerar aberrações estruturais são chamados de clastogênicos [42, 43].

O processo pelo qual as AC são formadas é muito complexo e não está totalmente esclarecido. Entretanto, acredita-se que essas alterações podem ser induzidas por mecanismo direto, onde a substância química atua diretamente sobre o DNA, ou por mecanismo indireto como, por exemplo, dano oxidativo ou inibição da síntese de DNA (inibição da enzima polimerase, p.ex.) [44].

Swierenga et al. [42] apresentaram evidências de que as AC poderiam ocorrer como um efeito secundário da citotoxicidade devido a doses relativamente elevadas de uma substância. O mecanismo de toxicidade é importante para determinar se ocorre uma aberração, já que muitas substâncias são muito tóxicas, mas não causam aberrações. Estes pesquisadores utilizando células CHO para o melhor entendimento da relação entre citotoxicidade e indução de AC de algumas substâncias químicas conhecidas por induzirem quebra da dupla fita de DNA, chegaram à conclusão que nem toda substância tóxica é também genotóxica. Isto pode ser devido ao fato que os caminhos que conduzem à quebra da fita de DNA e à formação da aberração podem ser diferentes das substâncias que não danificam o DNA e podem estar em um limiar abaixo do qual a indução de aberrações poderia não ocorrer.

Dentre as vantagens do sistema-teste utilizando CHO destacam-se a facilidade na padronização das condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura e densidade populacional) devido à uniformidade metabólica e comportamental do material; possibilidade dos tratamentos das células serem realizados em várias fases do ciclo celular; rapidez; economia; boa

reprodutibilidade; organização dos cromossomos e de seu DNA relativamente semelhantes às células *in vivo* [45]. O sistema-teste *in vitro* é de grande importância por fornecer dados fundamentais sobre a ação da substância testada, como clastogênica, aneugênica, ação direta ou indireta sobre o DNA e nível de toxicidade [38].

A citotoxicidade deve ser determinada com ou sem ativação metabólica, usando um apropriado indicador de integridade celular e crescimento, tal como medida de confluência, contagem de células viáveis ou índice mitótico (IM) [42]. Entretanto, a maioria das linhagens celulares utilizadas em ensaios *in vitro* não tem capacidade de metabolização de drogas, havendo a necessidade, portanto, da adição de sistemas de metabolização [46]. Nesse sentido, a ativação metabólica deve ser feita com a fração S9 (fração microsomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254). Qualquer concentração entre 1 a 10% (v/v) do fígado homogeneizado S9 pode ser usada no meio de cultura final [47].

O uso do controle positivo faz parte de todo estudo de genética toxicológica, tanto *in vivo* como *in vitro*. Há várias vantagens como verificar as condições de manutenção das células, facilitar a comparação de dados de um laboratório para outro, ajudar no estabelecimento de critérios mínimos de aceitação do ensaio e assegurar precisamente que todos os passos em um experimento foram seguidos. Como controle positivo, devem ser empregados agentes clastogênicos conhecidos ou aneugênicos para uma reprodutibilidade adequada e detectável aumento de alterações demonstrando a sensibilidade do sistema-teste [48].

1.4 PRÓPOLIS E *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA*

O uso de produtos naturais ou seus componentes ativos para a prevenção e/ou tratamento de doenças crônicas está baseado primeiramente na medicina popular de várias sociedades étnicas e nos dados epidemiológicos [6]. Nesse sentido, a própolis, uma substância natural resinosa coletada pelas abelhas de brotos, exsudatos de árvores e de outras partes do tecido vegetal e modificado na colméia por adição de secreções salivares e cera [49], é utilizada em suplementos com o propósito de manter e melhorar a saúde humana e prevenir doenças como inflamação, cardiopatias, diabetes e câncer [50].

O nome própolis é derivado do grego *pro*, em defesa de, e *polis*, a cidade, o que quer dizer: “em defesa da cidade ou da colméia” [51]. As abelhas, de fato, usam esta substância para protegê-las contra insetos e microorganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos à colméia, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores [51, 52].

As atividades biológicas da própolis são conhecidas desde a antiguidade. Os egípcios conheciam muito bem suas propriedades antiputrefativas e a usavam para embalsamar cadáveres. A própolis foi muito utilizada como antisséptico bucal e cicatrizante em tratamento de ferimentos durante a Idade Média pelos médicos árabes. Os incas utilizavam a própolis como agente antipirético. A Farmacopéia Inglesa do século XVII já listava a própolis como medicamento. Tornou-se muito popular entre os séculos XVII e XX por sua atividade antibacteriana [53].

Atualmente, a própolis é usada como um produto natural estando disponível na forma de cápsulas, em extrato, em creme dental, pastilhas para garganta, cremes e na forma de pó para ser dissolvido em água. É muito recomendada pelos fitoterapeutas por suas propriedades antimicrobiana, hepatoprotetora e antiinflamatória, além de ser usada para aumentar a resistência do corpo às infecções e para tratar úlceras gastroduodenais [53]. A utilização na indústria cosmética se dá na forma de cremes faciais, pomadas, loções e soluções, sendo usada não só no Brasil como também na França, em produtos como sabonetes, água de colônia, *shampoo*, loção pós barba e bronzeador. A Romênia e a Rússia possuem especializações medicamentosas a base de própolis muito utilizadas contra acne [54].

Muitos pesquisadores estudam a própolis em todo mundo, mas várias pesquisas estão voltadas à própolis Brasileira, devido às atividades biológicas que possui [55].

A própolis possui várias atividades biológicas tais como antibacteriana [56, 57], antifúngica [56, 58, 59], antiparasitária [60], antiinflamatória [53, 56, 61], anestésica e propriedades antioxidantes [62]. Outras propriedades biológicas têm sido reportadas, incluindo, citotoxicidade, atividades anti-HIV [63] e antitumoral [64].

A composição química da própolis é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas. De modo geral contém: 56-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos

como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, etc, e pequenas quantidades de vitaminas B12, B2, B6, C e E [65].

A espécie *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae; Fig. 4) é uma planta nativa do Brasil comumente conhecida como “alecrim do campo” e “vassoura”. O extrato das folhas da *B. dracunculifolia* é usado popularmente como antipirético e no tratamento de doenças gastrointestinais no Brasil, além de poder ser uma fonte promissora de componentes naturais para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas quimio-profiláticos [66].

A *B. dracunculifolia* foi indicada como a mais importante origem botânica da própolis verde [55, 67]. A cor verde é consequência de sua origem botânica, porque as abelhas coletam tecidos jovens contendo clorofila, isto é, brotos vegetativos e folhas não expandidas de *B. dracunculifolia*. Tais folhas jovens contêm tricomas glandulares, provavelmente com óleos essenciais, dando consequentemente o típico aroma da própolis verde [51]. Os brotos, as folhas ainda jovens e as folhas expandidas foram coletados separadamente por Park et al. [63], os quais obtiveram os correspondentes extratos etanólicos. Estes pesquisadores prepararam também o extrato etanólico da própolis coletada na mesma região onde se encontrava a *B. dracunculifolia*. Os extratos foram analisados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa para análise qualitativa e quantitativa dos flavonóides e outros compostos fenólicos. Os picos obtidos foram comparados com a substância pura. Os resultados demonstraram que os compostos químicos encontrados na própolis são os mesmos que os encontrados em *B. dracunculifolia*.

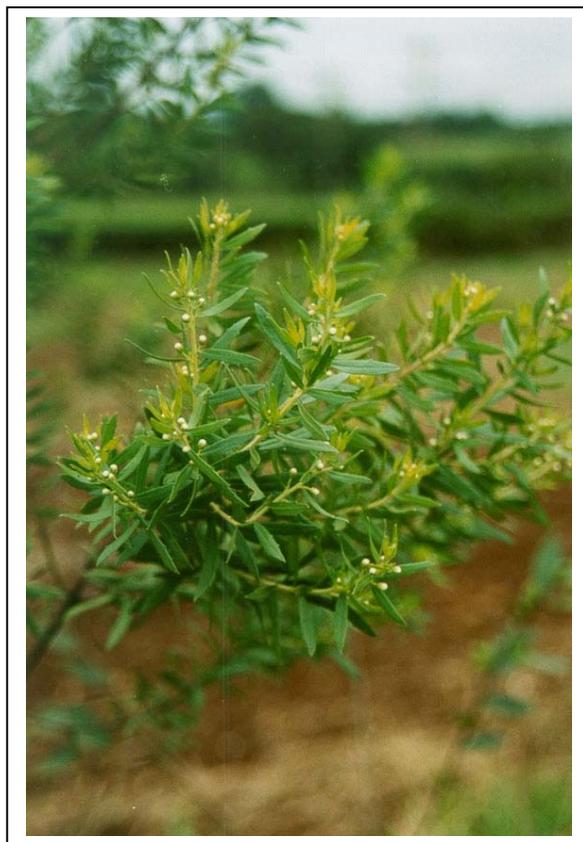


Figura 4 – *Baccharis dracunculifolia*

Foram identificados flavonóides no exudato das folhas da *B. dracunculifolia* que são específicos da própolis verde, inclusive, em concentrações similares provando que as espécies *Baccharis* constituem a principal origem botânica da própolis na região de cerrado no sul de Minas [67].

Em um outro estudo utilizando CLAE, Kumazawa et al. [55] relataram a mesma composição de ápices de brotos de *B. dracunculifolia* e da própolis verde. Os principais metabólitos identificados em ambas amostras foram derivados prenilados e não-prenilados do ácido cinâmico. Park et al. [63] identificaram também o ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico (artepelin C), uma conhecida substância

antimicrobiana, que estava presente tanto na própolis quanto nos extratos da *B. dracunculifolia*. A presença de artepelin C foi comprovada pela utilização de um padrão autêntico através de análise em CLAE. As análises mostraram que o artepelin C estava em maior concentração quando comparado aos demais constituintes químicos.

Os constituintes químicos dos extratos das folhas da *B. dracunculifolia* têm mostrado serem bem semelhantes àqueles da própolis verde [63, 68]. Estes resultados sugerem que os extratos das folhas de *B. dracunculifolia* podem apresentar atividades biológicas similares àquelas descritas para a própolis [69].

Missima et al. [70] mostraram que os extratos das folhas de *B. dracunculifolia* são capazes de ativar macrófagos *in vitro*, com conseqüente liberação de peróxido de hidrogênio, dependendo da sua concentração. Entretanto, mais estudos biológicos e fitoquímicos são necessários para investigar a atividade imunomodulatória dos extratos brutos da *B. dracunculifolia*, assim como de seus metabólicos secundários. Já De Funari et al. [71] confirmaram a *B. dracunculifolia* como a principal origem botânica da própolis do Sudeste do Brasil, principalmente no Estado de São Paulo, através de cromatografias, e investigaram a atividade biológica em relação aos fibroblastos NIH-3T3 de camundongos, células superficiais diretamente envolvidas no processo de cicatrização, demonstrando que a própolis originada da *B. dracunculifolia* exerce um efeito citotóxico sobre estas células.

Lemos et al. [72] demonstraram que os extratos hidroalcoólicos da *B. dracunculifolia* apresentam atividade antiúlcera, inibindo significativamente a formação de úlceras induzidas em diferentes modelos experimentais, e diminuindo

a secreção gástrica. Esses resultados são semelhantes aos do extrato da própolis verde, e podem colaborar no uso da *B. dracunculifolia* na medicina popular, contribuindo na sua validação farmacológica. Se a *B. dracunculifolia* e a própolis verde apresentam atividades biológicas similares, os extratos da *B. dracunculifolia* podem ser incorporados com sucesso na medicina humana e veterinária.

Enfim, apesar de suas propriedades biológicas, a composição química da própolis pode variar com a localização geográfica e a origem botânica [73], fato que dificulta a padronização de produtos comerciais com propósitos terapêuticos [74]. Nesse sentido, sabendo-se que a *B. dracunculifolia* é a principal origem botânica da própolis verde, se ambas apresentarem atividades biológicas similares, os extratos da *B. dracunculifolia* poderiam ser incorporados com sucesso nos produtos farmacêuticos. Além disso, muitos estudos com espécies do gênero *Baccharis* têm mostrado grandes avanços devido ao seu reputado uso na medicina caseira na América Latina, seu grande potencial de metabólitos secundários e atividades descritas na medicina popular, deixando um vastíssimo campo aberto para a pesquisa de novas moléculas ativas [75].

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos mutagênico e/ ou antimutagênico e citotóxico do extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia* (EAE- Bd) em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. Para tanto, foram analisados a frequência de PCEMNs e o índice de divisão nuclear (IDN) em medula óssea (24 h) e sangue periférico (24 h e 48 h) de ratos Wistar (sistema-teste *in vivo*) e a frequência de AC e o IM em células CHO (sistema-teste *in vitro*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Avaliar a frequência de danos cromossômicos (PCEMN, *in vivo*; AC, *in vitro*) induzidos pelos tratamentos com diferentes concentrações de EAE-Bd afim de se avaliar a mutagenicidade;
- B. Avaliar a frequência de danos cromossômicos (PCEMN, *in vivo*; AC, *in vitro*) induzidos pelos tratamentos simultâneos com diferentes concentrações de EAE-Bd e com doxorubicina (DXR) para determinar a possível antimutagenicidade;
- C. Avaliar a citotoxicidade pelos valores de IDN (*in vivo*) e IM (*in vitro*) obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *B. DRACUNCULIFOLIA*

As folhas de *B. dracunculifolia* De Candolle foram coletadas em Cajuru, Estado de São Paulo, Brasil, em dezembro de 2005. A planta foi autenticada por Jimi N. Nakagima, e um exemplar (SPFR 06143) foi depositado no herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo. As partes aéreas da planta foram acondicionadas em estufa de ar circulante em 40° C por 48 h. As folhas (500 g) foram submetidas à maceração por 24 h em acetato etílico à temperatura ambiente. O solvente foi evaporado à vácuo sob 40° C, e 32,0 g do EAE-Bd foram obtidos.

O EAE-Bd, utilizado no presente estudo, bem como as informações sobre a sua composição química foram fornecidos pelo Prof. Dr. Jairo K. Bastos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo. O extrato em acetato de etila foi submetido à análise em CLAE, a qual permitiu a identificação dos seguintes compostos: ácido cafeíco; ácido-*p*-cumárico; 4'-*O*-étermetil aromadendrina, drupanina, artepelin C e baccharina (Fig. 5).

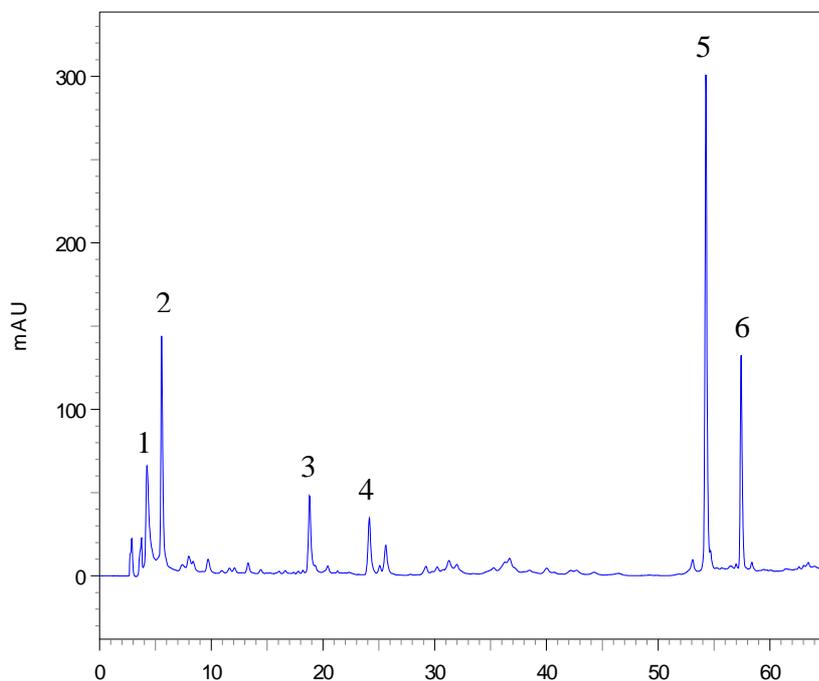


Figura 5 – Análise utilizando CLAE do extrato em acetato de etila de *B. dracunculifolia*. ácido cafeíco (1); ácido-*p*-cumárico (2); 4'-*O*-étermetil aromadendrina (3), drupanina (4), artepelin C (5) e baccharina (6).

3.2 AGENTE QUÍMICO INDUTOR DE DANOS CROMOSSÔMICOS

DXR (Pharmacia Brasil Ltda., São Paulo) dissolvido em água destilada foi usado como o indutor de micronúcleos e AC (controle positivo) nos sistemas-testes *in vivo* (90 mg/Kg de peso corpóreo, p.c.) [76] e *in vitro* (1,5 µg/mL), respectivamente. As doses de DXR foram selecionadas baseado na sua eficiência em induzir danos cromossômicos.

3.3. SISTEMA-TESTE *IN VIVO*: MICRONÚCLEOS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO

3.3.1 ANIMAIS

Para os experimentos foram usados ratos Wistar com aproximadamente 6–7 semanas, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo. A pesquisa foi conduzida de acordo com os protocolos aceitos internacionalmente para o uso e cuidado de animais de laboratório. Os animais foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($50\pm 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* a ração e água. O protocolo usado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Franca (proc. nº 003/06A, anexo 1).

3.3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os ratos foram divididos em diferentes grupos experimentais de seis animais cada (três machos e três fêmeas), de acordo com o apresentado na Tabela 1. As doses de EAE-Bd foram selecionadas com base em estudos de mutagênese e antimutagênese prévios usando a própolis verde [77] e foram administradas aos animais por gavagem (1 mL/100 g p.c.), seguido por uma injeção intraperitoneal (i.p) de DXR (0,5 mL/100 g p.c.). As diferentes doses de EAE-Bd (6, 12 e 24 mg/kg p.c.) foram obtidas a partir de uma solução estoque de 2,4 mg/mL

em 5,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em água. O grupo solvente foi tratado por gavagem (1 mL/100 g p.c.) com a mesma dose de DMSO que os animais que receberam 24 mg EAE-Bd/kg p.c. As amostras de medula óssea foram coletadas 24 h após os tratamentos e as amostras de sangue periférico foram coletadas após 24 h e 48 h.

Tabela 1 – Grupos experimentais e protocolos dos tratamentos

| Tratamento | Grupo ^a | Dose |
|--------------------------|--------------------|---------------------|
| Controle negativo (Água) | 1 | - |
| DMSO | 2 | 300 mg/kg p.c. |
| EAE-Bd I | 3 | 6 mg/kg p.c. |
| EAE-Bd II | 4 | 12 mg/kg p.c. |
| EAE-Bd III | 5 | 24 mg/kg p.c. |
| DXR | 6 | 90 mg/kg p.c., i.p. |
| DMSO + DXR | 7 | Como em (2) e (6) |
| EAE-Bd I + DXR | 8 | Como em (3) e (6) |
| EAE-Bd II + DXR | 9 | Como em (4) e (6) |
| EAE-Bd III + DXR | 10 | Como em (5) e (6) |

DMSO, dimetilsulfóxido; EAE-Bd, extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia*; DXR, doxorubicina.

^aCada grupo de tratamento apresenta seis animais (três machos e três fêmeas).

3.3.3 TESTE DE MICRONÚCLEOS

Para obtenção de PCEMNs em medula óssea foi realizada a técnica de MacGregor et al. [78], cujos procedimentos foram:

- A. A eutanásia dos animais foi por eterização, retirou-se os fêmures, limpou-se com gaze, e cortou-se as epífises;
- B. Introduziu-se a agulha da seringa contendo 0,5 ml de soro bovino fetal no canal medular e lavou-se o canal em um tubo de centrífuga contendo 2 ml de soro. Homogenizou-se o material;
- C. Centrifugou-se a 1.000 rpm por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante deixando apenas uma pequena quantidade do mesmo e misturou-se o “pellet” com uma pipeta Pasteur;
- D. Colocou-se uma gota do material no canto superior da lâmina e com uma lamínula realizou-se o esfregaço;
- E. Secou-se e fixou-se em metanol por 5 minutos;
- F. No dia seguinte corou-se com Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 na proporção 1:30 por 5 minutos;
- G. Analisou-se os micronúcleos em PCEs que se coraram de azul e que são mais jovens. Os NCEs são mais maduros e se coraram de laranja.

Para obtenção de PCEMNs em sangue periférico foi realizada a técnica de MacGregor et al. [79], a qual consiste nos seguintes procedimentos:

- A. Cortou-se a ponta da cauda dos animais e gotejou-se o sangue diretamente sobre as lâminas secas;
- B. Fez-se o esfregaço do material com uma lamínula;
- C. Após a secagem do material, este foi fixado em metanol por 5 minutos;
- D. No dia seguinte, corou-se com Giemsa diluído em solução tampão fosfato pH 6,8 na proporção de 1:10 por 20 minutos;
- E. Analisou-se os micronúcleos em PCEs que se coraram de azul e que são mais jovens. Os NCEs são mais maduros e se coraram de laranja.

3.3.4 ANÁLISE DAS LÂMINAS

Para a determinação da freqüência de PCEMNs, 2000 PCEs por animal foram analisados nas amostras de medula óssea e 2000 PCEs nas amostras de sangue periférico (24 h e 48 h), em microscopia de luz sob imersão. Um total de 400 eritrócitos por animal foram analisados para calcular o IDN (PCE/PCE + NCE) em cada amostra de medula óssea e sangue periférico a fim de se determinar a citotoxicidade dos tratamentos [80].

A porcentagem de redução na freqüência de PCEMNs foi calculada de acordo com Waters et al. [81], usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Redução} = \frac{\text{freqüência de PCEMNs em A} - \text{freqüência de PCEMNs em B}}{\text{freqüência de PCEMNs em A} - \text{freqüência de PCEMNs em C}}$$

onde A é a grupo tratado com DXR (controle positivo), B, o grupo tratado com EAE-Bd mais DXR, e C, o grupo tratado com água (controle negativo).

3.4 SISTEMA TESTE *IN VITRO*: CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS

3.4.1 CULTIVO DE CÉLULAS

A linhagem empregada para a realização do experimento foi a CHO₉, gentilmente cedida pelo Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Esta linhagem encontrou-se estocada em nitrogênio líquido (-195° C), em alíquotas de 1×10^6 células/mL, em uma solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura (HAM F10 + DEM, na proporção 1:1, Sigma- Aldrich), 40% de soro bovino fetal (Nutricell) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich).

Para a realização dos experimentos, as células foram rapidamente descongeladas e colocadas em cultivo em meio de cultura, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Nutricell), 1,2 g/mL de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 0,1 g/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 0,06 g/mL de penicilina (Sigma-Aldrich).

As células foram cultivadas em monocamada em 10 mL de meio de cultura utilizando-se frascos estéreis descartáveis de 25 cm² de área (Corning) a 37°C em estufa de B.O.D (Marconi). A cada dois ou três dias, quando já apresentavam uma boa confluência, as células foram subcultivadas. Para isso, removeu-se o meio de cultura e as células foram lavadas usando-se PBS (*phosphate buffer saline*) e ATV (solução de tripsina 0,2% + versene 0,2%, Instituto Adolfo Lutz) na proporção de 1 ATV:1 PBS, para desprender as células de superfície interna do frasco de cultura. Após o despreendimento das células, 1,5 mL de meio de cultura completo foi

adicionado ao frasco para a inativação do ATV e homogeneizado. Uma pequena quantidade de células foi, então, colocada em cultivo em novos frascos contendo 10 mL de meio de cultura, e foram incubadas a 37° C.

Para realização dos experimentos, cerca de 2 h antes do início, as células foram subcultivadas e uma quantidade de aproximadamente 1×10^6 de células em fase exponencial de crescimento foram semeadas em cada frasco de cultura para serem tratadas. Para a contagem das células foi utilizada a câmara de Newbauer.

3.4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As culturas foram tratadas com diferentes concentrações de EAE-Bd (12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$) dissolvidas em DMSO (Sigma-Aldrich), 3 h antes da fixação, quando a maior parte das células se encontram na fase G_2 do crescimento celular [42]. As concentrações de EAE-Bd foram determinadas através de experimentos realizados previamente com a própolis verde [82]. Para análise da antimutagenicidade do EAE-Bd, três concentrações (12,5; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$) foram associadas ao quimioterápico DXR (1,5 $\mu\text{g/mL}$), 3 h antes da fixação. Após uma hora de tratamento, as culturas tratadas com DXR isoladamente ou associadas com o EAE-Bd ou DMSO (50,0 $\mu\text{L/mL}$) foram lavadas com PBS e reincubadas somente com EAE-Bd ou DMSO até o final do cultivo. Além das culturas submetidas ao tratamento simultâneo com EAE-Bd e DXR, foram realizadas culturas de células tratadas somente com DXR, e seus respectivos

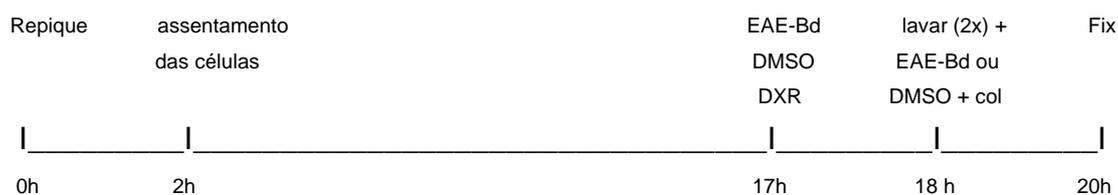
controles negativo e solvente (DMSO). Dessa forma, os grupos de tratamento estão apresentados na Tabela 2:

Tabela 2 – Grupos experimentais e protocolo dos tratamentos

| Tratamento | Grupo | Dose |
|-------------------|-------|-------------------|
| Controle negativo | 1 | - |
| DMSO | 2 | 55,0 µg/ mL |
| EAE-Bd I | 3 | 12,5 µg/ mL |
| EAE-Bd II | 4 | 25,0 µg/ mL |
| EAE-Bd III | 5 | 50,0 µg/ mL |
| EAE-Bd IV | 6 | 100,0 µg/ mL |
| DXR | 7 | 1,5 µg/ mL |
| DMSO + DXR | 8 | Como em (2) e (7) |
| EAE-Bd I + DXR | 9 | Como em (3) e (7) |
| EAE-Bd II + DXR | 10 | Como em (4) e (7) |
| EAE-Bd III + DXR | 11 | Como em (5) e (7) |

DMSO, dimetilsulfóxido; EAE-Bd, extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia*; DXR, doxorubicina.

O protocolo de tratamento seguiu o seguinte delineamento experimental recomendado por protocolos internacionais que determinam experimentos com um ciclo celular e meio, ou seja, 18 h [47]:



Obs: EAE-Bd = extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia*; DXR = doxorubicina; col = colcemide; fix = fixação.

3.4.3 TESTE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As preparações metafásicas para a análise convencional de AC foram obtidas segundo a técnica de Preston et al. [39], com modificações. Para bloquear as células em metáfase, 2 h antes da fixação foi adicionada uma solução de colcemide (0,1 µg/ mL). Os procedimentos são descritos a seguir:

- A. Transferiu-se o meio de cultivo para tubos de centrifuga, lavou-se cada frasco de cultura com 5 mL de PBS,
- B. Adicionou-se 0,5 mL de uma solução 1 PBS: 1 ATV em cada frasco para desprender as células,
- C. Colocou-se 5 mL do meio de cultivo que estava no tubo de centrifuga no frasco de cultivo para inativação do ATV e transferiu-se toda a solução para o tubo de centrifuga,

- D. Centrifugou-se a 1000 rpm por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante, adicionaram-se 10 mL de solução hipotônica de citrato de sódio 1% a 37° C, homogeneizou-se ate completar 12 minutos,
- E. Centrifugou-se a 1000 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante, homogeneizou-se o sedimento e acrescentaram-se 5 mL de fixador recém-preparado (3 partes de metanol: 1 parte de acido acético),
- F. Repetiu-se esse procedimento mais 2 vezes e, na ultima etapa, ressuspendeu-se com cerca de 0,5 mL de fixador.

Lâminas geladas foram utilizadas. A coloração da lâmina foi feita com Giemsa a 3% diluído em tampão fosfato, pH 6,8 por 5 minutos.

3.4.4 ANÁLISE DAS LÂMINAS

As lâminas foram analisadas em teste cego. A análise foi realizada em metáfases bem espalhadas, sem sobreposição e com 21 ± 2 cromossomos. Foram analisadas 100 metáfases por cultura em microscópio de luz e em objetiva de imersão. Para a análise do IM foi contado o número de células metafásicas em 2000 células.

Foram realizadas 3 repetições, sendo analisadas 300 metáfases por tratamento para a freqüência de AC e 6000 células para a obtenção do IM. As aberrações foram classificadas de acordo com Savage [83]. A porcentagem de redução na freqüência de AC foi calculada por meio do número de células com AC

encontradas após o tratamento com DXR menos o número encontrado com o tratamento anticlastogênico dividido pelo número observado cm DXR menos o número obtido no controle negativo [81], ou seja:

$$\% \text{ de Redução} = \frac{\text{freqüência de AC em A} - \text{freqüência de AC em B}}{\text{freqüência de AC em A} - \text{freqüência de AC em C}}$$

onde A são as culturas tratadas com DXR (controle positivo), B, as culturas tratadas com EAE-Bd mais DXR, e C, o controle negativo.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da análise das freqüências de PCEMNs e IDN obtidos no sistema-teste *in vivo* foram analisados estatisticamente por análise de variância para experimentos inteiramente aleatorizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “p-value”. Nos casos em que $P < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. As freqüências de AC, metáfases alteradas (MA) e IM observados no sistema-teste *in vitro* foram analisados estatisticamente pelo teste do X^2 para experimentos inteiramente aleatorizados, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. Os “gaps” não foram incluídos na análise estatística, uma vez que o seu significado citogenético não é bem estabelecido [42].

4 RESULTADOS

4.1 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*: MICRONÚCLEOS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO

Os resultados obtidos nos tratamentos com as diferentes concentrações de EAE-Bd e/ ou DXR, e seus respectivos controles, em medula óssea e sangue periférico (24 h e 48 h) de ratos Wistar estão apresentados respectivamente nas Tabelas 3-6 e Fig. 6.

Os dados mostram que houve uma certa variabilidade interindividual nas freqüências de PCEMNs entre os animais, dentro de cada grupo de tratamento, tanto em medula óssea como nos dois tempos de amostragem em sangue periféricos (Tabelas 3 e 4, respectivamente).

Nenhuma diferença significativa nas freqüências de PCEMNs em medula óssea ou sangue periférico foi observada entre os animais tratados com as diferentes concentrações de EAE-Bd quando comparados com os animais dos grupos do controle negativo e solvente, demonstrando ausência de efeito mutagênico do EAE-Bd nas doses usadas. Por outro lado, os animais tratados com DXR mostraram freqüências de PCEMNs significativamente maiores nas células de medula óssea e sangue periférico quando comparados com os controles ($P < 0,05$).

A Tabela 5 mostra a somatória das freqüências de PCEMNs em células de medula óssea dos ratos tratados com EAE-Bd e/ ou DXR, e seus respectivos controles. A administração de uma única dose de cada concentração de EAE-Bd

simultaneamente com uma injeção de DXR resultou em uma redução significativa ($P < 0,05$) de aproximadamente 60% na frequência de PCEMNS induzida pela DXR quando comparada com o grupo tratado somente com o antitumoral.

Os resultados somados do teste de micronúcleos em sangue periférico (24 h e 48 h) de ratos Wistar tratados com EAE-Bd e/ ou DXR, e seus respectivos controles estão apresentados na Tabela 6. Em todos os tratamentos com DXR, as frequências de PCEMNs foram maiores nas amostras coletadas 48 h após os tratamentos quando comparadas com àquelas coletadas após 24 h (Fig. 6). Este resultado está de acordo com os dados relatados pelo Grupo de Estudo Colaborativo para o Teste de Micronúcleos [84], mostrando que os picos de PCEMNs em sangue periférico são observados 48 h após os tratamentos. Entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Os tratamentos com EAE-Bd apresentaram uma redução significativa na frequência de micronúcleos em PCEs do sangue periférico induzidos pela DXR. A redução foi de 50 a 60% nas amostras coletadas após 24 h, e de 43 a 70% nas amostras coletadas após 48 h. Um efeito protetor dose-dependente não significativo da EAE-Bd foi observado somente nas amostras de sangue periférico coletadas 48 h após os tratamentos (Tabela 6).

A frequência de PCEMNs foi menor nos animais tratados com DMSO e DXR do que naqueles tratados somente com DXR, tanto em medula óssea como em sangue periférico (24 h e 48 h), mas as diferenças não foram estatisticamente significativas (Tabelas 5 e 6). Nenhuma diferença significativa nas frequências de PCEMNs nas células de medula óssea ou sangue periférico foi observada entre machos e fêmeas ($P > 0,05$).

Comparando-se as frequências de PCEMNs entre medula óssea e sangue periférico (24 h e 48 h), observa-se resultados similares, sendo que a redução na frequência de PCEMNs observada no tratamento com 24 mg de EAE-Bd/ kg p.c. mais DXR nas amostras coletadas de sangue periférico após 48 h foi mais acentuada do que observada nas amostras de medula óssea e sangue periférico (24 h), mas estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Fig. 6).

As médias de IDN e seus respectivos desvios-padrão estão apresentados nas Tabelas 3-6. Nenhuma redução significativa na porcentagem de PCEs em relação ao número total de eritrócitos foi observada em qualquer dos grupos de tratamento comparado com o controle negativo tanto em medula óssea como em sangue periférico, demonstrando a ausência de citotoxicidade nos diferentes tratamentos nas condições experimentais apresentadas.

Esses resultados encontram-se descritos e discutidos no artigo publicado no periódico *Mutation Research* (anexo 2) [85].

Tabela 3 – Dados individuais das freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e índices de divisão nuclear (IDN) em medula óssea de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles

| Tratamentos | Sexo | PCEMNs | | IDN |
|-------------------|------|--------|------|------|
| | | Nº | % | |
| Controle negativo | M1 | 1 | 0,05 | 0,41 |
| | M2 | 0 | 0,0 | 0,64 |
| | M3 | 3 | 0,15 | 0,60 |
| | F1 | 1 | 0,05 | 0,58 |
| | F2 | 1 | 0,05 | 0,76 |
| | F3 | 2 | 0,10 | 0,53 |
| DMSO | M1 | 1 | 0,05 | 0,65 |
| | M2 | 2 | 0,10 | 0,68 |
| | M3 | 5 | 0,25 | 0,67 |
| | F1 | 3 | 0,15 | 0,78 |
| | F2 | 7 | 0,35 | 0,61 |
| | F3 | 4 | 0,20 | 0,72 |
| EAE-Bd I | M1 | 3 | 0,15 | 0,58 |
| | M2 | 5 | 0,25 | 0,78 |
| | M3 | 5 | 0,25 | 0,67 |
| | F1 | 2 | 0,10 | 0,74 |
| | F2 | 2 | 0,10 | 0,67 |
| | F3 | 5 | 0,25 | 0,64 |
| EAE-Bd II | M1 | 2 | 0,10 | 0,57 |
| | M2 | 2 | 0,10 | 0,54 |
| | M3 | 2 | 0,10 | 0,75 |
| | F1 | 6 | 0,30 | 0,65 |
| | F2 | 4 | 0,20 | 0,70 |
| | F3 | 2 | 0,10 | 0,63 |
| EAE-Bd III | M1 | 6 | 0,30 | 0,56 |
| | M2 | 3 | 0,15 | 0,69 |
| | M3 | 2 | 0,10 | 0,60 |
| | F1 | 0 | 0,0 | 0,61 |
| | F2 | 4 | 0,20 | 0,67 |
| | F3 | 3 | 0,15 | 0,58 |

continuação

continuação

| | | | | |
|------------------|----|----|------|------|
| DXR | M1 | 16 | 0,80 | 0,32 |
| | M2 | 15 | 0,75 | 0,64 |
| | M3 | 9 | 0,45 | 0,54 |
| | F1 | 12 | 0,60 | 0,48 |
| | F2 | 15 | 0,75 | 0,54 |
| | F3 | 16 | 0,80 | 0,51 |
| DMSO + DXR | M1 | 12 | 0,60 | 0,47 |
| | M2 | 13 | 0,65 | 0,60 |
| | M3 | 12 | 0,60 | 0,48 |
| | F1 | 12 | 0,60 | 0,41 |
| | F2 | 9 | 0,45 | 0,66 |
| | F3 | 16 | 0,80 | 0,51 |
| EAE-Bd I + DXR | M1 | 1 | 0,05 | 0,61 |
| | M2 | 5 | 0,25 | 0,51 |
| | M3 | 6 | 0,30 | 0,59 |
| | F1 | 10 | 0,50 | 0,55 |
| | F2 | 9 | 0,45 | 0,55 |
| | F3 | 4 | 0,20 | 0,63 |
| EAE-Bd II + DXR | M1 | 2 | 0,10 | 0,77 |
| | M2 | 8 | 0,40 | 0,68 |
| | M3 | 3 | 0,15 | 0,59 |
| | F1 | 7 | 0,35 | 0,51 |
| | F2 | 5 | 0,25 | 0,64 |
| | F3 | 12 | 0,60 | 0,40 |
| EAE-Bd III + DXR | M1 | 3 | 0,15 | 0,60 |
| | M2 | 7 | 0,35 | 0,56 |
| | M3 | 5 | 0,25 | 0,53 |
| | F1 | 9 | 0,45 | 0,44 |
| | F2 | 9 | 0,45 | 0,52 |
| | F3 | 3 | 0,15 | 0,58 |

M, macho; F, fêmea.

Foram analisadas 2000 células/ animal.

EAE-Bd = extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia* (I = 6 mg/kg p.c.; II = 12 mg/kg p.c.; III = 24 mg/kg p.c.); DMSO = dimetilsulfóxido; DXR = doxorubicina.

Tabela 4 – Dados individuais das freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e índices de divisão nuclear (IDN) em sangue periférico (24 h e 48 h) de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles

| Tratamentos | Sexo | PCEMNs | | | | IDN | |
|-------------------|------|--------|------|------|------|------|------|
| | | Nº | | % | | 24 h | 48 h |
| | | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | | |
| Controle negativo | M1 | 3 | 5 | 0,15 | 0,25 | 0,12 | 0,21 |
| | M2 | 0 | 4 | 0,00 | 0,20 | 0,08 | 0,11 |
| | M3 | 4 | 3 | 0,20 | 0,15 | 0,17 | 0,15 |
| | F1 | 7 | 2 | 0,35 | 0,10 | 0,09 | 0,16 |
| | F2 | 4 | 0 | 0,20 | 0,00 | 0,19 | 0,16 |
| | F3 | 5 | 4 | 0,25 | 0,20 | 0,15 | 0,14 |
| DMSO | M1 | 5 | 5 | 0,25 | 0,25 | 0,13 | 0,12 |
| | M2 | 3 | 4 | 0,15 | 0,20 | 0,11 | 0,13 |
| | M3 | 9 | 5 | 0,45 | 0,25 | 0,11 | 0,16 |
| | F1 | 5 | 3 | 0,25 | 0,15 | 0,07 | 0,17 |
| | F2 | 5 | 2 | 0,25 | 0,10 | 0,15 | 0,13 |
| | F3 | 2 | 7 | 0,10 | 0,35 | 0,20 | 0,16 |
| EAE-Bd I | M1 | 5 | 7 | 0,25 | 0,35 | 0,14 | 0,13 |
| | M2 | 3 | 0 | 0,15 | 0,00 | 0,17 | 0,17 |
| | M3 | 4 | 5 | 0,20 | 0,25 | 0,17 | 0,15 |
| | F1 | 3 | 3 | 0,15 | 0,15 | 0,18 | 0,14 |
| | F2 | 2 | 8 | 0,10 | 0,40 | 0,13 | 0,16 |
| | F3 | 8 | 5 | 0,40 | 0,25 | 0,17 | 0,15 |
| EAE-Bd II | M1 | 5 | 5 | 0,25 | 0,25 | 0,32 | 0,12 |
| | M2 | 5 | 2 | 0,25 | 0,10 | 0,08 | 0,13 |
| | M3 | 1 | 9 | 0,05 | 0,45 | 0,19 | 0,16 |
| | F1 | 5 | 4 | 0,25 | 0,20 | 0,08 | 0,17 |
| | F2 | 6 | 6 | 0,30 | 0,30 | 0,19 | 0,19 |
| | F3 | 3 | 7 | 0,15 | 0,35 | 0,14 | 0,15 |
| EAE-Bd III | M1 | 0 | 4 | 0,0 | 0,20 | 0,06 | 0,13 |
| | M2 | 8 | 2 | 0,40 | 0,10 | 0,14 | 0,16 |
| | M3 | 0 | 5 | 0,0 | 0,25 | 0,12 | 0,13 |
| | F1 | 3 | 6 | 0,15 | 0,30 | 0,10 | 0,15 |
| | F2 | 6 | 0 | 0,30 | 0,00 | 0,13 | 0,17 |
| | F3 | 3 | 6 | 0,15 | 0,30 | 0,15 | 0,16 |

continuação

continuação

| | | | | | | | |
|------------------|----|----|----|------|------|------|------|
| DXR | M1 | 10 | 19 | 0,50 | 0,95 | 0,07 | 0,10 |
| | M2 | 10 | 24 | 0,50 | 1,20 | 0,11 | 0,07 |
| | M3 | 12 | 20 | 0,60 | 1,00 | 0,11 | 0,15 |
| | F1 | 16 | 20 | 0,80 | 1,00 | 0,17 | 0,12 |
| | F2 | 12 | 27 | 0,60 | 1,35 | 0,11 | 0,08 |
| | F3 | 19 | 9 | 0,95 | 0,45 | 0,10 | 0,16 |
| DMSO + DXR | M1 | 16 | 14 | 0,80 | 0,70 | 0,06 | 0,08 |
| | M2 | 10 | 12 | 0,50 | 0,60 | 0,11 | 0,08 |
| | M3 | 12 | 19 | 0,60 | 0,95 | 0,20 | 0,11 |
| | F1 | 9 | 16 | 0,45 | 0,80 | 0,07 | 0,09 |
| | F2 | 10 | 8 | 0,50 | 0,40 | 0,15 | 0,22 |
| | F3 | 13 | 6 | 0,65 | 0,30 | 0,08 | 0,15 |
| EAE-Bd I + DXR | M1 | 4 | 12 | 0,20 | 0,60 | 0,11 | 0,15 |
| | M2 | 10 | 14 | 0,50 | 0,70 | 0,10 | 0,11 |
| | M3 | 7 | 13 | 0,35 | 0,65 | 0,12 | 0,11 |
| | F1 | 7 | 5 | 0,35 | 0,25 | 0,06 | 0,05 |
| | F2 | 13 | 14 | 0,65 | 0,70 | 0,10 | 0,13 |
| | F3 | 10 | 16 | 0,50 | 0,80 | 0,11 | 0,09 |
| EAE-Bd II + DXR | M1 | 5 | 16 | 0,25 | 0,80 | 0,05 | 0,12 |
| | M2 | 11 | 13 | 0,55 | 0,65 | 0,12 | 0,10 |
| | M3 | 4 | 9 | 0,20 | 0,45 | 0,08 | 0,15 |
| | F1 | 9 | 14 | 0,45 | 0,70 | 0,09 | 0,12 |
| | F2 | 11 | 10 | 0,55 | 0,50 | 0,09 | 0,11 |
| | F3 | 8 | 10 | 0,40 | 0,50 | 0,08 | 0,09 |
| EAE-Bd III + DXR | M1 | 10 | 12 | 0,50 | 0,60 | 0,07 | 0,12 |
| | M2 | 5 | 4 | 0,25 | 0,20 | 0,10 | 0,16 |
| | M3 | 7 | 5 | 0,35 | 0,25 | 0,13 | 0,15 |
| | F1 | 9 | 11 | 0,45 | 0,55 | 0,05 | 0,10 |
| | F2 | 9 | 10 | 0,45 | 0,50 | 0,09 | 0,09 |
| | F3 | 5 | 9 | 0,25 | 0,45 | 0,12 | 0,15 |

M, macho; F, fêmea.

Foram analisadas 2000 células/ animal.

EAE-Bd = extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia* (I = 6 mg/kg p.c.; II = 12 mg/kg p.c.; III = 24 mg/kg p.c.); DMSO = dimetilsulfóxido; DXR = doxorubicina.

Tabela 5 – Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e índices de divisão nuclear (IDN) em medula óssea de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles

| Tratamentos | IDN ^a | PCEMNs/1000 PCEs ^b | Redução (%) |
|-------------------|------------------|----------------------------------|-------------|
| Controle negativo | 0,59 ± 0,11 | 0,67 | - |
| DMSO | 0,68 ± 0,06 | 1,83 | - |
| EAE-Bd I | 0,68 ± 0,07 | 1,83 | - |
| EAE-Bd II | 0,64 ± 0,08 | 1,50 | - |
| EAE-Bd III | 0,62 ± 0,05 | 1,50 | - |
| DXR | 0,51 ± 0,11 | 6,92 ^c | - |
| DMSO + DXR | 0,52 ± 0,09 | 6,17 ^c | - |
| EAE-Bd I + DXR | 0,57 ± 0,04 | 2,92 ^d | 64,0 |
| EAE-Bd II + DXR | 0,60 ± 0,13 | 3,08 ^d | 61,3 |
| EAE-Bd III + DXR | 0,48 ± 0,16 | 3,00 ^d | 62,7 |

Um total de 12000 eritrócitos policromáticos (PCEs) foram analisados por grupo.

EAE-Bd = extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia* (I = 6 mg/kg p.c.; II = 12 mg/kg p.c.; III = 24 mg/kg p.c.); DMSO = dimetilsulfóxido; DXR = doxorubicina.

^a Valores são médias ± DP. 400 eritrócitos foram analisados por animal, sendo um total de 2400 células por tratamento (PCE/PCE + NCE).

^b 2000 PCEs foram analisados por animal, sendo um total de 12000 células por tratamento.

^c Significativamente diferente do grupo controle ($P < 0,05$).

^d Significativamente diferente do grupo DXR ($P < 0,05$).

Tabela 6 – Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e índices de divisão nuclear (IDN) em sangue periférico (24 h e 48 h) de animais submetidos ao tratamento com diferentes doses de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles

| Tratamentos | IDN ^a | | PCEMNs/1000 PCEs ^b | | Redução (%) | |
|-------------------|------------------|-------------|----------------------------------|---------------------|----------------|------|
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| Controle negativo | 0,13 ± 0,04 | 0,12 ± 0,19 | 1,92 | 1,50 | - | - |
| DMSO | 0,13 ± 0,04 | 0,15 ± 0,02 | 2,42 | 2,17 | - | - |
| EAE-Bd I | 0,16 ± 0,02 | 0,13 ± 0,01 | 2,08 | 2,17 | - | - |
| EAE-Bd II | 0,17 ± 0,08 | 0,15 ± 0,03 | 2,08 | 2,75 | - | - |
| EAE-Bd III | 0,12 ± 0,03 | 0,15 ± 0,01 | 1,67 | 1,92 | - | - |
| DXR | 0,11 ± 0,03 | 0,11 ± 0,04 | 6,58 ^c | 10,67 ^c | - | - |
| DMSO + DXR | 0,11 ± 0,05 | 0,12 ± 0,05 | 5,83 ^c | 8,67 ^c | - | - |
| EAE-Bd I + DXR | 0,10 ± 0,02 | 0,11 ± 0,03 | 4,25 ^d | 6,67 ^{c,d} | 50,0 | 43,6 |
| EAE-Bd II + DXR | 0,08 ± 0,02 | 0,12 ± 0,02 | 4,00 ^d | 5,50 ^{c,d} | 55,5 | 56,4 |
| EAE-Bd III + DXR | 0,09 ± 0,03 | 0,13 ± 0,03 | 3,75 ^d | 4,25 ^{c,d} | 60,7 | 70,0 |

Um total de 12000 eritrócitos policromáticos (PCEs) foram analisados por grupo.

EAE-Bd = extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia* (I = 6 mg/kg p.c.; II = 12 mg/kg p.c.; III = 24 mg/kg p.c.); DMSO = dimetilsulfóxido; DXR = doxorubicina.

^a Valores são médias ± DP. 400 eritrócitos foram analisados por animal, sendo um total de 2400 células por tratamento (PCE/PCE + NCE).

^b 2000 PCEs foram analisados por animal, sendo um total de 12000 células por tratamento.

^c Significativamente diferente do grupo controle ($P < 0,05$).

^d Significativamente diferente do grupo DXR ($P < 0,05$).

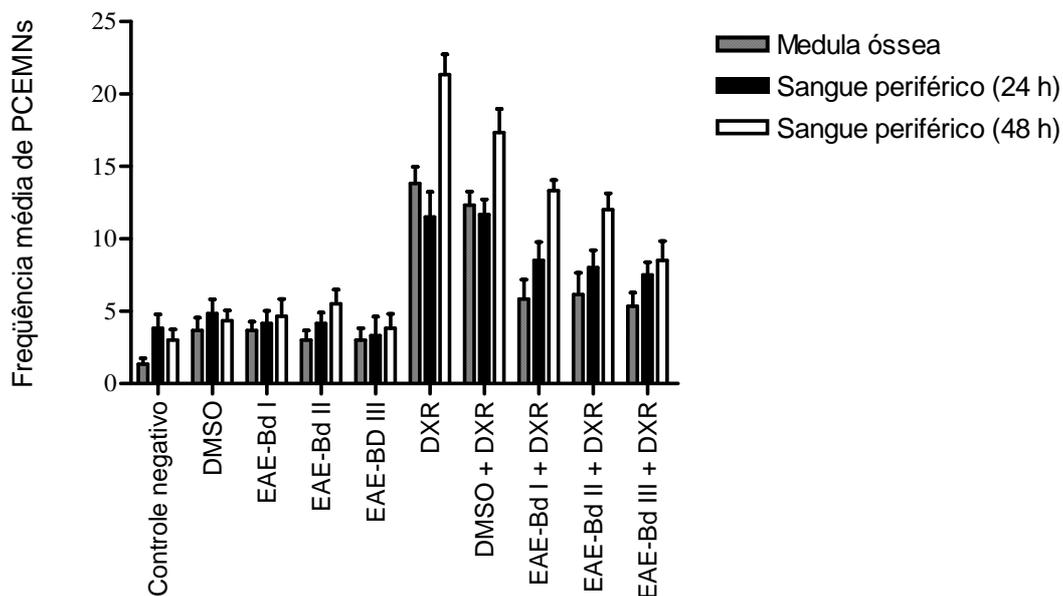


Figura 6 – Comparação das freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) entre as células de medula óssea e sangue periférico (24 h e 48 h) de ratos Wistar tratados com diferentes doses de EAE-Bd e/ou DXR, e seus respectivos controles.

4.2 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*: CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS

Os resultados obtidos nos tratamentos com diferentes concentrações de EAE-Bd e/ ou DXR, e seus respectivos controles estão apresentados nas Tabelas 7-9, e Fig. 7. Os dados mostram uma pequena variabilidade na freqüência de AC e MA entre as repetições experimentais dentro de alguns grupos de tratamento (Tabela 7). Quando os dados foram somados, pode-se observar que as culturas tratadas com 12,5; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de EAE-Bd não apresentaram freqüências de AC e MA estatisticamente diferentes do controle negativo ($P > 0,05$). Entretanto, as culturas tratadas com 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de EAE-Bd apresentaram um

aumento estatisticamente significativo nas freqüências de AC e MA quando comparadas ao controle negativo (Tabela 8).

Por outro lado, as culturas tratadas com a associação de 12,5 µg/mL de EAE-Bd e DXR apresentaram uma redução estatisticamente significativa na freqüência de AC e MA quando comparada ao grupo tratado isoladamente com DXR ($P < 0,001$). Essa redução foi de 72,41% do número de metáfases anormais induzidas pela DXR. No entanto, as culturas tratadas com 25,0 e 50,0 µg/mL de EAE-Bd e DXR apresentaram freqüências de AC e MA que não diferiram estatisticamente daquelas observadas para as culturas tratadas somente com DXR (Tabela 9; Fig. 7).

Com relação às culturas tratadas com DMSO e DXR, os resultados obtidos revelaram freqüências de AC e MA semelhantes às aquelas observadas para culturas tratadas isoladamente com DXR (Tabelas 8 e 9).

As AC mais freqüentes foram quebras cromatídicas, seguidas de *gaps* cromatídicos. Houve também a observação de quebras isocromatídicas, aberrações como *complex exchange*, figuras trirradiais e quadrirradiais (Tabelas 7 e 8).

Os resultados obtidos da análise do IM revelaram que as culturas tratadas com DXR, em associação ou não com EAE-Bd, apresentaram valores menores em relação às culturas controle, mas estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Tabela 9).

Tabela 7 – Frequências de aberrações cromossômicas (AC), metáfases alteradas (MA) e índices mitóticos (IM) observados em culturas de células de ovário de hamster Chinês submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de EAE-Bd e/ou DXR, e respectivos controles

| Tratamentos | AC | | | | | Total | MA | IM (%) |
|-------------------|----|-----|----|-----|------------|-------|----|--------|
| | G' | G'' | Q' | Q'' | OTA | | | |
| Controle negativo | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 3 | 8,65 |
| | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 10,55 |
| | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 3 | 7,55 |
| DMSO | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 4 | 4 | 11,15 |
| | 1 | 1 | 4 | 0 | 0 | 6 | 6 | 7,80 |
| | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 | 10,15 |
| EAE-Bd I | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 7,10 |
| | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 6 | 6 | 11,75 |
| | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 6 | 6 | 5,65 |
| EAE-Bd II | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 3 | 7,05 |
| | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | 5 | 5 | 5,75 |
| | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 2 | 8,30 |
| EAE-Bd III | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 4 | 8,90 |
| | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 4 | 4 | 9,00 |
| | 2 | 1 | 4 | 0 | 0 | 7 | 7 | 8,60 |
| EAE-Bd IV | 0 | 0 | 4 | 2 | 0 | 6 | 6 | 9,65 |
| | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 5 | 11,55 |
| | 2 | 0 | 5 | 1 | 1Ex | 9 | 9 | 8,85 |
| DXR | 4 | 1 | 9 | 2 | 2Ex | 18 | 18 | 7,50 |
| | 5 | 1 | 5 | 2 | 0 | 13 | 13 | 7,30 |
| | 1 | 0 | 7 | 4 | 2Tri; 1Ex | 15 | 15 | 4,90 |
| DMSO + DXR | 2 | 1 | 5 | 2 | 2Ex | 12 | 12 | 6,05 |
| | 1 | 0 | 11 | 0 | 0 | 12 | 11 | 5,95 |
| | 0 | 2 | 16 | 1 | 1Qua; 1Tri | 21 | 17 | 5,40 |
| EAE-Bd I + DXR | 3 | 0 | 2 | 1 | 0 | 6 | 6 | 7,50 |
| | 4 | 0 | 6 | 0 | 0 | 10 | 10 | 4,35 |
| | 2 | 0 | 2 | 0 | 2Ex | 6 | 6 | 4,55 |

continuação

continuação

| | | | | | | | | |
|------------------|---|---|----|---|-----------|----|----|------|
| EAE-Bd II + DXR | 1 | 0 | 8 | 2 | 1Tri; 2Ex | 14 | 12 | 3,80 |
| | 2 | 0 | 4 | 3 | 2Tri; 2Ex | 13 | 11 | 4,85 |
| | 2 | 0 | 10 | 2 | 3Ex | 17 | 15 | 4,65 |
| EAE-Bd III + DXR | 7 | 0 | 7 | 2 | 0 | 16 | 16 | 8,90 |
| | 3 | 0 | 5 | 5 | 1Tri; 1Ex | 15 | 15 | 5,60 |
| | 5 | 0 | 9 | 0 | 1Ex | 15 | 14 | 4,30 |

Para cada cultura analisou-se 100 células metafásicas para a determinação da frequência de AC e 2.000 células foram contadas para a obtenção do IM.

EAE-Bd = extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia* (I = 12,5 µg/mL; II = 25 µg/mL; III = 50 µg/mL; 100 µg/mL); DMSO = dimetilsulfóxido; DXR = doxorubicina.

G', *gap* cromatídico; G'', *gap* isocromatídico; Q', quebra cromatídica; Q'', quebra isocromatídica; OTA, outros tipos de alterações; Ex, *Complex Exchange*; Tr, figura trirradial; Qua, figura quadrirradial.

Tabela 8 – Somatória das freqüências de aberrações cromossômicas (AC) e metáfases alteradas (MA) (incluindo gaps) observadas em culturas de ovário de hamster Chinês submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de EAE-Bd e/ou DXR, e respectivos controles

| Tratamentos | AC | | | | | Total | AC/ 100 células | MA |
|-------------------|----|-----|----|-----|---------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | G' | G'' | Q' | Q'' | OTA | | | |
| Controle negativo | 2 | 0 | 5 | 0 | 0 | 7 | 2,3 | 7 |
| DMSO | 3 | 0 | 9 | 0 | 0 | 12 | 4,0 | 12 |
| EAE-Bd I | 2 | 0 | 12 | 0 | 0 | 14 | 4,6 | 14 |
| EAE-Bd II | 2 | 0 | 8 | 1 | 0 | 11 | 3,6 | 10 |
| EAE-Bd III | 6 | 1 | 7 | 1 | 0 | 15 | 5,0 | 15 |
| EAE-Bd IV | 2 | 0 | 14 | 3 | 1Ex | 20 ^a | 6,6 ^a | 20 ^a |
| DXR | 10 | 2 | 21 | 8 | 2Tr; 3Ex | 46 ^a | 15,3 ^a | 46 ^a |
| DMSO + DXR | 3 | 3 | 32 | 3 | 2Ex; 1Qr; 1Tr | 45 ^a | 15,0 ^a | 40 ^a |
| EAE-Bd I + DXR | 9 | 0 | 10 | 1 | 2Ex | 22 ^{a,b} | 7,3 ^{a,b} | 22 ^{a,b} |
| EAE-Bd II + DXR | 6 | 0 | 22 | 7 | 7Ex; 3Tr | 44 ^a | 14,6 ^a | 38 ^a |
| EAE-Bd III + DXR | 15 | 0 | 21 | 7 | 2Ex; 1Tr | 46 ^a | 15,3 ^a | 45 ^a |

Para cada tratamento foram analisadas 300 células metafásicas para a obtenção das freqüências de AC.

EAE-Bd = extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia* (I = 12,5 µg/mL; II = 25 µg/mL; III = 50 µg/mL; IV = 100 µg/mL); DMSO = dimetilsulfóxido; DXR = doxorubicina.

G', *gap* cromatídico; G'', *gap* isocromatídico; Q', quebra cromatídica; Q'', quebra isocromatídica; OTA, outros tipos de alterações; Ex, *Complex Exchange*; Tri, figura trirradial; Qua, figura quadrirradial.

^a Significativamente diferente do controle negativo ($P < 0,05$).

^b Significativamente diferente do grupo DXR ($P < 0,001$).

Tabela 9 – Índices mitóticos médios (IM), total e porcentagem da frequência de células com aberrações cromossômicas (AC) (excluindo os gaps), e a porcentagem de redução da frequência de aberrações observadas nas culturas de CHO tratadas com EAE-Bd e/ ou DXR, e seus respectivos controles

| Tratamentos | IM | Células com AC | | Redução (%) |
|-------------------|--------------|--------------------|-------|-------------|
| | Média ± DP | Total | % | |
| Controle negativo | 8,92 ± 2,30 | 5 | 1,66 | - |
| DMSO | 9,92 ± 1,86 | 9 | 3,00 | - |
| EAE-Bd I | 8,16 ± 3,18 | 12 | 4,00 | - |
| EAE-Bd II | 7,03 ± 1,27 | 8 | 2,66 | - |
| EAE-Bd III | 8,83 ± 0,20 | 8 | 2,66 | - |
| EAE-Bd IV | 10,01 ± 1,37 | 18 ^a | 6,00 | - |
| DXR | 6,63 ± 2,29 | 34 ^a | 11,33 | - |
| DMSO + DXR | 5,80 ± 0,12 | 34 ^a | 11,33 | - |
| EAE-Bd I + DXR | 4,88 ± 0,57 | 13 ^{a, b} | 4,33 | 72,41 |
| EAE-Bd II + DXR | 4,63 ± 1,86 | 32 ^a | 10,66 | 6,90 |
| EAE-Bd III + DXR | 6,27 ± 5,62 | 30 ^a | 10,00 | 13,79 |

Para cada tratamento foram analisadas 300 células metafásicas para a obtenção das frequências de AC, e 6000 células para o IM.

EAE-Bd = extrato em acetato de etila das folhas de *B. dracunculifolia* (I = 12,5 µg/mL; II = 25 µg/mL; III = 50 µg/mL; IV = 100 µg/mL); DMSO = dimetilsulfóxido; DXR = doxorubicina.

^aSignificativamente diferente do controle negativo ($P < 0,05$)

^bSignificativamente diferente do grupo DXR ($P < 0,001$)

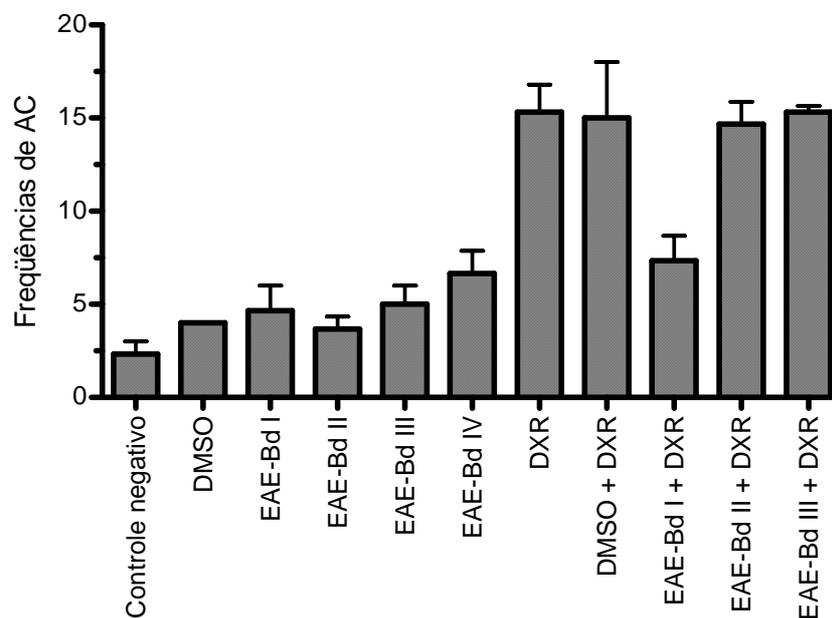


Figura 7 – Frequências médias de aberrações cromossômicas (AC) observadas em culturas de células de ovário de hamster Chinês submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de EAE-Bd e/ ou DXR, e respectivos controles. Para cada tratamento foram analisadas 300 células metafásicas.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a mutagenicidade e/ou antimutagenicidade do extrato em acetato de etila das folhas da *B. dracunculifolia* em medula óssea e sangue periférico de ratos Wistar (*in vivo*) e em células de CHO (*in vitro*).

Com relação ao sistema-teste *in vivo* empregado no presente estudo, a avaliação da indução de micronúcleos é um teste padrão usado em genética toxicológica, sendo recomendado como parte da bateria de testes genotóxicos usados para avaliação da segurança dos agentes químicos e físicos [26, 86].

Historicamente, os camundongos têm sido usados nos ensaios de micronúcleos, entretanto, os protocolos reguladores confirmam que camundongos ou ratos podem ser usados para a avaliação de mutagenicidade. Ratos e camundongos diferem em suas respostas na indução de micronúcleos [87]. Destas duas espécies de roedores, os ratos são mais aceitos como modelo animal em estudos toxicológicos, provendo uma enorme quantidade de dados farmacocinéticos, como metabolismo, distribuição e excreção da droga durante a avaliação toxicológica de novos agentes terapêuticos em desenvolvimento [26, 48]. Dessa maneira, o ensaio de micronúcleos em ratos usando medula óssea ou sangue periférico pode ser usado como uma alternativa para o ensaio de micronúcleos em camundongos.

A indução de danos cromossômicos em células da medula óssea e sangue periférico de roedores por determinados agentes pode resultar em respostas diferentes quando machos e fêmeas são analisados [46]. Segundo Hayashi et al. [32] quando houver evidência de diferença de toxicidade no metabolismo entre

machos e fêmeas, ambos deveriam ser usados nos experimentos. Como não havia dados sobre a toxicidade da EAE-Bd no metabolismo de machos e fêmeas, o presente trabalho analisou ambos os sexos, embora as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas. Ainda, MacGregor et al. [79] sugeriram que pelo menos 4 animais por grupo de tratamento fossem analisados. O presente estudo analisou 6 animais por grupo de tratamento.

A gavagem é indicada como a via normalmente usada para administração da substância-teste, sendo que as demais vias como injeções intraperitoneal e intravenosa, podem ser aceitas quando o seu uso for justificado [32]. No presente trabalho, as diferentes concentrações de EAE-Bd foram administradas por gavagem, por se tratar da via a qual o homem faz uso da *B. dracunculifolia*. Entretanto, os animais receberam o tratamento com a DXR pela via intraperitoneal, uma vez que esse modo de administração permite uma grande exposição das células da medula óssea e sangue periférico à substância [46]. Os efeitos deletérios das drogas quimioterápicas podem ser observados em todos os órgãos do organismo. Entretanto, as populações de células que apresentam uma taxa de proliferação celular rápida, tais como as células da medula óssea, são as mais sensíveis e vulneráveis [88].

As doses e o período de amostragem têm papel importante no sistema-teste empregado. Geralmente, pelo menos 3 doses são testadas. Em relação ao tempo de amostragem, no teste de micronúcleos em medula óssea, o pico de resposta pode variar entre aproximadamente 18-48 h após a administração, dependendo dos compostos testados e das doses [89]. No presente estudo, os animais foram sacrificados 24 h após o tratamento, pois de acordo com Au e Hsu

[90], este é o tempo onde ocorre o pico de alterações cromossômicas induzidas pela DXR em células somáticas de roedores. Já em testes com o sangue periférico, comparando experimentos com tempos de exposição de 24, 48 e 72 h após os tratamentos, o pico máximo é alcançado em 48 h. Entretanto, para algumas substâncias e doses, o pico de resposta parece preceder o tempo de exposição de 48 h [89]. No presente estudo, as frequências de PCEMNs, em todos os tratamentos com DXR, foram mais acentuadas nas amostras de sangue periférico coletadas com 48 h após os tratamentos do que nas amostras de 24 h.

A respeito do sistema-teste *in vitro* empregado é importante ressaltar que o teste de AC em culturas de mamíferos é um dos métodos mais utilizados para avaliação de agentes mutagênicos e/ ou carcinogênicos. Além das culturas de linfócitos do sangue periférico humano, podem ser usadas várias linhagens celulares provenientes de hamster Chinês, como por exemplo, as células CHO, células V79, células de pulmão de hamster Chinês (CHL; *chinese hamster lung*), etc [38]. No presente estudo foram utilizadas células CHO₉.

Swierenga et al. [42] avaliaram protocolos de AC em três tipos celulares: CHO, V79 e linfócitos humanos. Os resultados dos protocolos de CHO e V79 são similares e geralmente descritos em combinação. Galloway et al. [91] compararam testes *in vitro* para análise de AC em células CHO e CHL, analisando nove substâncias químicas diferentes, seguindo um mesmo protocolo, e encontraram resultados positivos para todos os produtos químicos testados com ambos os tipos celulares utilizados.

Miller et al. [92] coletaram dados fornecidos por quatro companhias farmacêuticas, a partir de ensaios realizados com linhagens celulares de hamster

Chinês (CHO-K5, CHO-K1 e V79) e linfócitos humanos, cuja comparação entre as frequências de AC e de micronúcleos mostrou uma correlação positiva (cerca de 88% de coincidência para 57 compostos testados).

Por meio da análise das frequências de AC induzidas por compostos químicos em dois tipos de linhagens celulares, células CHO e TK6 (linfoblastos humanos), Hilliard et al. [93] relataram que os resultados “falsos” positivos são mais acentuados em testes com células TK6 do que com células CHO. Nesse sentido, uma comparação das frequências de AC em CHO e linfócitos humanos foi realizada utilizando compostos com vários perfis genotóxicos. Dos dez compostos testados, os linfócitos humanos apresentaram mais resultados “falsos” positivos do que CHO, concluindo que os linfócitos humanos têm desvantagens como um teste de *screening*, mas que estes podem ser úteis para avaliar o risco de genotoxicidade aos seres humanos, para os compostos que são positivos em CHO [94]. Tais resultados indicam a validade e a sensibilidade do sistema-teste utilizado no presente trabalho, células CHO, sendo este adequado para avaliação da possível mutagenicidade da *B. dracunculifolia*.

As células CHO são úteis nos ensaios de AC e troca de cromátides-irmãs devido à sua estabilidade, curto tempo de geração, boa caracterização, baixo número de cromossomos e um cariótipo estável [42]. Entretanto, a maioria das linhagens celulares utilizadas em ensaios *in vitro*, como por exemplo, células CHO, não têm a capacidade de metabolização de substâncias. Para Galloway et al. [47] a ativação metabólica deve ser feita com a fração S9. No presente estudo, não foi utilizada a fração S9, pois concomitantemente foram realizados os testes *in vivo*. O sistema *in vitro* tem se mostrado eficiente na detecção de agentes

ambientais mutagênicos e antimutagênicos, apesar dos experimentos com animais vivos reproduzirem com maior semelhança as condições humanas [12].

As AC envolvem alterações classificadas de acordo com o seu tempo de formação relativo ao ciclo celular. Segundo Obe et al. [43] são consideradas duas principais classes de aberrações, dependendo se uma ou ambas as cromátides estão envolvidas em uma mesma alteração. Estas classes são do tipo cromatídica quando o cromossomo exibe uma cromátide normal e a outra com quebra, e do tipo cromossômica (ou isocromatídica) quando ambas as cromátides sofrem a quebra no mesmo *loci*. A produção de aberrações cromatídicas ou cromossômicas depende da natureza do agente clastogênico e do estágio do ciclo celular em que a célula alvo se encontra durante a exposição. No presente trabalho as células foram tratadas com as diferentes concentrações de EAE-Bd na fase G₂ do ciclo celular induzindo danos que preferencialmente levaram a formação de aberrações do tipo cromatídica.

Pesquisadores têm discutido sobre a inclusão ou exclusão de *gaps* como um tipo de AC, e existe uma tendência em considerá-los como uma falha na coloração ou como um evento de desnovelamento do DNA sem significado biológico [41]. Em termos citogenéticos, os *gaps* são vistos como uma região mais fina que a largura da cromátide, formada por uma secção na cromátide de modo que pareça descontínua, mas as duas regiões adjacentes ainda estão conectadas por uma “linha” fina de DNA, que parece invisível. Assim, no presente trabalho os *gaps* não foram incluídos na análise estatística, embora estejam entre as AC mais encontradas.

Os resultados *in vivo* obtidos no presente estudo mostraram que a *B. dracunculifolia* não aumentou as freqüências de células micronucleadas. Sendo assim, este extrato não apresentou efeito mutagênico no teste de micronúcleos em eritrócitos de ratos. Já os resultados *in vitro* mostraram que as culturas tratadas com 12,5; 25,0 e 50,0 µg/mL de EAE-Bd apresentaram freqüências de AC semelhantes às daquelas das culturas controle. Entretanto, as culturas tratadas com a maior concentração de EAE-Bd (100,0 µg/mL) mostraram um aumento significativo na freqüência de AC quando comparadas ao grupo controle, revelando a mutagenicidade do EAE-Bd na maior concentração testada.

Além disso, os resultados também mostraram que a *B. dracunculifolia* causa uma redução significativa nas freqüências de PCEMNs (*in vivo*) e AC (*in vitro*; concentração de 12,5 µg/mL) induzidas pela DXR. Os mecanismos responsáveis pelos efeitos antimutagênicos da *B. dracunculifolia* ainda não são completamente entendidos. Entretanto, as propriedades antioxidantes dessa planta podem ser responsáveis em parte pelo efeito protetor observado nesse estudo, já que a atividade mutagênica do agente quimioterápico DXR é atribuída à sua capacidade de produzir radicais livres [95].

A DXR é um antibiótico do tipo antraciclina usado como agente antitumoral contra leucemias, linfomas e vários tumores sólidos, tendo também uma ampla variedade de efeitos tóxicos, incluindo cardiotoxicidade, citotoxicidade e a indução de AC [96, 97], pois a estrutura química da DXR pode se ligar ao ferro e assim formar complexos com o DNA, induzindo quebra da dupla fita [98].

Os resultados obtidos da análise do IM revelaram que as culturas tratadas com DXR, em associação ou não com EAE-Bd, apresentaram valores menores em relação às culturas controle, mas estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Esses dados podem ser atribuídos aos efeitos citotóxicos da DXR, por meio da intercalação no DNA e pela geração de radicais livres [99].

Um radical livre é qualquer molécula que contém um ou mais elétrons não pareados. Segundo Halliwell [100] existe muita confusão com relação à terminologia empregada para os radicais livres. O termo “espécies de oxigênio reativas” (ROS; *reactive oxygen species*) é um nome coletivamente aplicado aos radicais livres, incluindo aqueles não derivados do oxigênio, sendo esse o motivo pelo qual alguns autores preferem usar o termo “espécies derivadas do oxigênio”.

ROS são implicados na carcinogênese não somente porque modificam estruturalmente o DNA, resultando em mutações, mas também porque podem induzir respostas proliferativas nas células [101]. Um aumento na produção de radicais livres e/ou uma redução nos níveis de antioxidantes pode resultar em lesão celular [102].

As enzimas catalase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione S-transferase são as principais enzimas envolvidas nos sistemas de proteção endógena chamados de reserva antioxidante do organismo. Já os tocoferóis, carotenóides, flavonóides, ácido ascórbico, glutathione reduzida e ácido úrico são exemplos de antioxidantes não enzimáticos. Os pró-oxidantes são formados, principalmente, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, onde o oxigênio consumido sofre processo de redução monovalente, dando origem a intermediários extremamente reativos, às espécies

ativas de oxigênio, como o oxigênio singlet (O_2^1), o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$). Quando ocorre desequilíbrio entre pró e antioxidantes, aumenta a tendência de instalação do dano oxidativo [103].

Os estudos fitoquímicos sobre espécies do gênero *Baccharis* demonstraram além da presença de flavonóides (principalmente flavonas e flavonóis), diterpenos (com esqueletos das classes labdanos e clerodanos) e triterpenos [75], sugerindo que esses componentes fenólicos podem ter um papel importante na atividade antimutagênica observada no presente trabalho. Tapia et al. [104] demonstraram que os efeitos benéficos de algumas espécies de *Baccharis* podem ser atribuídos, pelo menos em parte, à captura de radicais livres dos compostos fenólicos, considerando que a atividade antioxidante foi observada nos extratos contendo derivados de ácido cinâmico.

Estudos sugerem que os polifenóis presentes em plantas na dieta pode ter efeito positivo no estresse oxidativo relacionado à doenças [105]. *B. trinervis* and *B. cordifolia* foram relatadas inibir a peroxidação lipídica pela liberação de radicais hidróxi e superóxido, sendo essa atividade associada à presença de flavonóides [106, 107]. Os extratos de *B. grisebachii* também mostraram atividades como o seqüestro de radicais livres e inibiu a lipoperoxidação nos eritrócitos, atividades que podem ser devidas principalmente aos componentes fenólicos, incluindo os flavonóides e derivados do ácido *p*-cumárico, afirmando seu uso como uma planta medicinal para o tratamento de doenças gastrointestinais [104]. Os componentes das folhas dos brotos da *B. dracunculifolia* apresentaram uma atividade de captura

de radicais livres semelhante à da própolis verde, e flavonóides são encontrados abundantemente em ambos [69].

O artepelin C (ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico) é o principal componente presente nas folhas da EAE-Bd. Esta substância é um excelente capturador de radicais livres, semelhante às catequinas [108]. Além disso, de acordo com Shimizu et al. [109], o artepelin C na dieta, quando alcança o fígado, estimula a atividade dos elementos responsáveis pela antioxição, induz a expressão das enzimas da fase II para detoxificação de carcinógenos e subseqüentemente suprime a formação de lesões pré-neoplásicas. Sendo assim, um outro possível mecanismo da EAE-Bd na redução de danos cromossômicos causados pela DXR pode ser atribuído à ação do artepelin C sob as enzimas de detoxificação.

Nesse sentido, Nakasugi e Komai [8] demonstraram a presença de substâncias antimutagênicas no extrato metanólico das folhas de *B. trimera* Less, conhecida como carqueja no Brasil, sendo estes quatro flavonas: genkwanina, cirsimaritina, hispidulina e apigenina. Os autores mostraram que um dos mecanismos desmutagênicos dessas flavonas foi a inibição da ativação metabólica do mutagênico Trp-P-2 (3-amino-1-metil-5-*H*-pirido-[4,3-*b*]- indol).

O EAE-Bd pode ter atuado como um agente desmutagênico, uma vez que esse é o provável mecanismo de ação dos antimutagênicos que são efetivos nos tratamentos simultâneos, por meio da interceptação e inativação dos compostos mutagênicos ou pela inibição da ativação metabólica dos pró-mutagênicos [12].

Em relação ao efeito dose-dependência, no presente trabalho um efeito protetor dose-dependente não significativo da EAE-Bd foi observado somente nas amostras de sangue periférico coletadas 48 h após o tratamento. A falta da

relação dose-resposta observada nas amostras coletadas após 24 h podem ser atribuídas, em parte, pelo fato que o pico de resposta de PCEMNs em sangue periférico pode ser observado em 48 h após os tratamentos [84]. De acordo com Chatterjee e Raman [110] a proteção eficiente de um agente é observada quando a frequência de aberrações induzida é alta e a concentração do agente protetor administrada é suficiente. Por outro lado, a avaliação do efeito-resposta é complicada pelo fato que muitas substâncias quimiopreventivas agem simultaneamente em diferentes níveis de proteção [16]. Baseado nesses dados, sugere-se que a falta de relação dose-resposta observada *in vivo* pode ser atribuída devido à ativação de diferentes mecanismos dependendo das doses de EAE-Bd e do período de amostragem.

Semelhante à própolis verde [82], foi observado no estudo *in vitro* que a *B. dracunculifolia* apresenta características de uma substância “Janus”, um termo designado para substâncias que se comportam como agentes mutagênicos e antimutagênicos dependendo das condições experimentais usadas [111]. A maior concentração de EAE-Bd foi mutagênica, enquanto que a menor concentração exerceu efeito quimiopreventivo contra os danos induzidos pela DXR no sistema-teste utilizado.

De acordo com von Borstel e Higgins [111], numerosos mecanismos moleculares podem estar envolvidos na atividade “Janus” de um composto químico, mas em geral a indução de uma enzima específica do sistema antimutagênico e a saturação do sistema enzimático envolvido no reparo do DNA podem ser sugeridos. Mersch-Sundermann et al. [80] observaram o fenômeno

“Janus” no extrato etanólico da *Toxicodendron quercifolium*, uma preparação amplamente usada na homeopatia, em sistemas-testes *in vivo* e *in vitro*. Os efeitos mutagênicos e antimutagênicos do extrato foram atribuídos aos flavonóides, que também estão presentes na própolis verde e na *B. dracunculifolia*, podendo ser responsáveis pela atividade “Janus” observada *in vitro* no presente estudo.

Os flavonóides modulam as atividades das enzimas envolvidas na biotransformação de pré-carcinogênicos, alterando suas atividades biológicas, enquanto que em certas condições podem exibir atividade genotóxica por efeitos pró-oxidantes, originando intermediários reativos como espécies de radicais livres, podendo causar danos no material genético [112].

Enfim, existem evidências que algumas substâncias podem tanto induzir como prevenir danos. Por essa razão, antes de estabelecer uma estratégia quimiopreventiva, é necessário conhecer sob quais condições uma substância pode proteger o genoma humano [113]. Dessa maneira, mais estudos farmacológicos e toxicológicos do EAE-Bd, bem como dos seus metabólitos secundários, são necessários para delinear seus mecanismos de ação, e conseqüentemente proporcionar a utilização mais efetiva e segura de *B. dracunculifolia* em aplicações clínicas.

6 CONCLUSÕES

6.1 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*: MICRONÚCLEOS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO

O estudo sobre a possível mutagenicidade e/ ou antimutagenicidade das diferentes concentrações de EAE-Bd em sistema-teste *in vivo* em amostra de medula óssea e de sangue periférico, nas condições utilizadas, levou às seguintes conclusões:

- A) As freqüências de PCEMNs obtidas nos animais submetidos aos tratamentos com as diferentes concentrações de EAE-Bd não diferem significativamente daquelas observadas nos animais do grupo controle, mostrado assim, ausência de efeito mutagênico;
- B) Os resultados obtidos mostraram que os animais tratados com as diferentes concentrações de EAE-Bd e DXR concomitantemente, apresentaram freqüências de PCEMNs significativamente menores quando comparados àqueles tratados apenas com DXR, revelando sua atividade antimutagênica;
- C) Pode-se observar algumas diferenças entre machos e fêmeas, mas estas diferenças não foram estatisticamente significativas;
- D) Quando são comparados os dados das análises de PCEMNs obtidos em medula óssea e sangue periférico, pode-se observar resultados semelhantes. Entretanto, em todos os tratamentos com DXR, as

freqüências de PCEMNs foram maiores nas amostras coletadas com 48 h após os tratamentos quando comparadas com àquelas coletadas após 24 h e medula óssea, mas essas diferenças não são estatisticamente significativas;

- E) Um efeito protetor dose-dependente não significativo da EAE-Bd foi observado somente nas amostras de sangue periférico coletadas com 48 h, sendo que o tratamento com 24 mg/ kg p.c. de EAE-Bd apresentou a redução mais acentuada em relação às freqüências observadas em medula óssea e sangue periférico (24 h), mas estas diferenças não foram estatisticamente significativas;
- F) Os valores médios de IDN obtidos nos animais submetidos aos diversos tratamentos mostraram que não houve uma redução significativa da porcentagem de PCEs em relação ao total de eritrócitos em todos os grupos de tratamento quando comparados aos animais do controle negativo, mostrando a ausência de citotoxicidade dos diferentes tratamentos, nas condições utilizadas neste trabalho.

6.2 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*: CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS.

Com base nos resultados da avaliação do potencial mutagênico e/ou antimutagênico do EAE-Bd em culturas de células CHO, pode-se concluir que:

- A) As concentrações de 12,5; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ do EAE-Bd não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas freqüências de AC e MA em relação ao controle negativo, revelando ausência de mutagenicidade. Entretanto, o tratamento com 100,0 $\mu\text{g/mL}$ do EAE-Bd mostrou um aumento significativo nas freqüências de AC e MA quando comparadas às culturas não submetidas a qualquer tratamento, mostrando assim um efeito mutagênico nessa concentração;
- B) As culturas tratadas com 12,5 $\mu\text{g/mL}$ do EAE-Bd associada à DXR apresentaram uma redução estatisticamente significativa na freqüência de AC e MA em relação ao controle positivo (DXR), apresentando uma atividade antimutagênica. Entretanto, o tratamento com 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ do EAE-Bd associada à DXR não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas freqüências de AC e MA em relação ao tratamento isolado com DXR;
- C) Os resultados obtidos da análise do IM revelaram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as culturas tratadas com diferentes concentrações do EAE-Bd e/ ou DXR, e seus respectivos controles negativo e solvente, revelando ausência de citotoxicidade.

7 REFERÊNCIAS

- [1] KITANI, K.; KANAI, S.; IVY, G. O.; CARRILLO, M. C. Pharmacological modifications of endogenous antioxidant enzymes with special reference to the effects of deprenyl: a possible antioxidant strategy. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 111, p. 211-221, 1999.
- [2] VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, v. 160, p. 1-40, 2006.
- [3] FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, v. 198, p. 147-159, 2004.
- [4] AGGARWAL, B.B.; TAKADA, Y.; OOMMEN, O. V. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 13, p. 1327-1338, 2004.
- [5] DORAI, T.; AGGARWAL, B. B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Letters*, v. 215, p. 129-140, 2004.
- [6] RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. *Mutation Research*, v. 544, p. 195-201, 2003.
- [7] DE FLORA, S.; FERGUSON, L. T. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*, v.591, p.8-15, 2005.
- [8] NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 2560 – 2564, 1998.
- [9] NOVICK, A.; SZILARD, L. Anti-mutagens. *Nature*, v. 170, p. 926-927, 1952.
- [10] LIVIERO, L.; VON BORSTEL, R. C. The 4 th International Conference on Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: a summary. *Mutation Research*, v. 350, p. 287-293, 1996.
- [11] KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. Environmental desmutagens and antimutagens. In: Klekowski, E.J. (Ed.). *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York, pp. 137-151, 1982.
- [12] KURODA, Y.; JAIN, K. A.; TEZUKA, H.; KADA, T. Animutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, v. 267, p. 201-209, 1992.

- [13] DE FLORA, S.; IZZOTTI, A. L.; D'AGOSTINI, F.; BALANSKY, R. M.; NOONAN, D.; ALBINI, A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other related diseases. *Mutation Research*, v. 480-481, p. 9-22, 2001.
- [14] DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, v. 402, p. 151-158, 1998.
- [15] GENTILE, J. M.; GENTILE, G.; LOHMAN, P. H.; FERGUSON, L. R. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: mechanistic studies. *Mutation Research*, v. 480, p. 1-7, 2001.
- [16] KNASMÜLLER S.; STEINKELLNER H. B. J.; MAJER E. C.; NOBIS G.; SCHARF G.; KASSIE, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspect and extrapolation aspect and extrapolation problems. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p. 1051-1062, 2002.
- [17] HEO, M. Y.; SOHN, S. J.; AU, W. W. Anti-genotoxicity of galangin as cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research*, v. 488, p. 135-150, 2001.
- [18] STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J. Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. *Mutation Research*, v.591, p. 16-23, 2005.
- [19] DE FLORA, S.; RAMEL, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, Classification and overview. *Mutation Research*, v. 202, p. 285-306, 1998.
- [20] GRAWE, J. Flow cytometric analysis of micronuclei in erythrocytes. *Methods in Molecular Biology*, v. 291, p. 69-83, 2005.
- [21] SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research*, v. 31, p. 9-15, 1975.
- [22] HEDDLE, J. A.; SALAMONE, M. F. Chromosomal aberrations and bone marrow toxicity. *Environmental Health Perspectives*, v. 39, p. 23-27, 1981.
- [23] VON LEDEBUR, M.; SCHMID, W. The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutation Research*, v. 19, p. 109-117, 1973.
- [24] MAVOURNIN, K. H; BLAKEY, D. H; CIMINO, M. C; SALAMONE, M. F; HEDDLE, J. A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, v. 239, p. 29-80, 1990.
- [25] HEDDLE, J. A.; CARRANO, A. V. The DNA content of micronuclei induced in bone marrow by gamma-radiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosome fragments. *Mutation Research*, v. 44, p. 63-69, 1977.

- [26] CAMMERER, Z.; ELHAJOUJI, A.; KIRSCH-VOLDERS, M.; SUTER, W. Comparison of the peripheral blood micronucleus test using flow cytometry in rat and mouse exposed to aneugens after single-dose applications. *Mutagenesis*, v. 22, p. 129-134, 2007.
- [27] FERGUSON, L. R.; MORCOMBE, P.; TRIGGS, C. N. The size of cytokinesis-blocked micronuclei in human peripheral blood lymphocytes as a measure of aneuploidy induction by Set A compounds in the EEC trial. *Mutation Research*, v. 287, p. 101-112, 1993.
- [28] JAGETIA, G. C.; NAYAK, V. Treatment of mice with a novel antineoplastic agent taxol before irradiation increases the frequency of micronuclei in the bone marrow. *Mutation Research*, v. 349, p. 219-227, 1996.
- [29] IGARASHI, M.; SHIMADA, H. An improved method for the mouse liver micronucleus test. *Mutation Research*, v. 391, p. 49-55, 1997.
- [30] ROBBIANO, L.; MERETO, E.; MIGLIAZZI MORANDO, A.; PASTORE, P.; BRAMBILLA, G. Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anaesthetics. *Mutation Research*, v. 413, p. 1-6, 1998.
- [31] ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; GRAWÉ, J.; ZETTEERBERG, 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*, v. 423, p. 113-124, 1999.
- [32] HAYASHI, M.; MACGREGOR, J.; GATEHOUSE, D. G.; ADLER, I.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol desing including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 234-252, 2000.
- [33] RIBEIRO, L. R. Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: Marques, E. K.; Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F. (Orgs). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora da Ulbra, cap. 7, p. 173-200, 2003.
- [34] HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; KIRSHVOLDERS, M.; JR OLESON, F. B.; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research*, v. 312, p. 292-304, 1994.
- [35] FENECH, M. Mouse and human micronucleus models for assessing genotoxicity of whole foods in intervention studies. *Mutation Research*, v. 290, p. 119-125, 1993.

- [36] MACGREGOR, J. T.; CASCIANO, D.; MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, v. 455, p. 3-20, 2000.
- [37] WITTE, I.; PLAPPERT, U.; WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to *in vitro* clastogenicity tests for early drug candidate selection. *Toxicological Sciences*, v. 97, p. 21-26, 2007.
- [38] TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidia. In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D.D M. F.; Marques, E. K. (Orgs). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora da Ulbra, cap. 6, p. 151-173, 2003.
- [39] PRESTON, R. J.; AU, W.; BENDER, M. A.; BREWEN, J. G.; CARRANO, A. V.; HEDDLE, J. A.; McFEE, A. F.; WOLFF, S.; WASSOM, J. S. Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays: a report of the U.S. EPA's gene-tox program. *Mutation Research*, v. 87 (2), p. 143-188, 1981.
- [40] ISHIDATE, M. Jr.; MIURA, K. F.; SOFUNI, T. Chromosome aberration assays in genetic toxicology testing *in vitro*. *Mutation Research*, v. 404, p. 167-72, 1998.
- [41] PAZ-Y-MIÑO, C.; DÁVALOS, M. V.; SÁNCHEZ, M. E.; ARÉVALO, M.; LEONE, P. E. Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. *Mutation Research*, v. 516, p. 57-61, 2002.
- [42] SWIERENGA, S. H. H.; HEDDLE, J. A.; SIGAL, E. A.; GILMAN, J. P. W.; BRILLINGER, R. L.; DOUGLAS, G. R.; NESTMANN, E. R. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, v. 246, p. 301-322, 1991.
- [43] OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A. T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE G. A.; DRETS, M. E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research*, v. 504 (1-2), p. 17-36, 2002.
- [44] MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, v. 11, p. 1515-1531, 2006.
- [45] RABELLO-GAY, M. N. Teste do micronúcleo em medula óssea. In: Rabello-Gay, M. N.; Rodrigues, M. A. L. R.; Monteleone-Neto, R. (Orgs). *Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese. Métodos e critérios de avaliação*. Ribeirão Preto: Editora da Sociedade Brasileira de Genética, p. 83-90, 1991.

- [46] PRESTON, R. J.; DEAN, B. J.; GALLOWAY, S.; HOLDEN, H.; McFEE, A. F.; SHELBY, M. Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Research*, v. 189, p. 157-165, 1987.
- [47] GALLOWAY, S. M.; AARDEMA, M. J.; ISHIDATE, M. Jr.; IVETT, J. L.; KIRKLAND, D. J.; MORITA, T.; MOSESSO, P.; SOFUNI, T. Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations. *Mutation Research*, v. 312, p. 241-261, 1994.
- [48] KRISHNA, G.; URDA, G.; PAULISSEN, J. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutation Research*, v. 453, p. 45-50, 2000.
- [49] GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, v. 60, p. 59-84, 1979.
- [50] OZKUL, Y.; SILICI, S.; EROGLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine*, v. 12, p. 742-747, 2005.
- [51] SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin na chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2, p. 33-38, 2005.
- [52] BANKOVA, V. S. Recent trend and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2, p. 29-32, 2005.
- [53] CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, v. 73, p. S1-S6, 2002.
- [54] MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, v. 19, p. 529-536, 1996.
- [55] KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 51, p. 740-742, 2003.
- [56] SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M.; MAIA, A. B.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A.; FARIAS, L. M. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 285-289, 2003.
- [57] DURAN, N.; MARCATO, P. D.; BUFFO, C. M.; DE AZEVEDO, M. M.; ESPOSITO, E. Poly (epsilon-caprolactone)/propolis extract: microencapsulation and antibacterial activity evaluation. *Die Pharmazie*, v. 69, p. 287-290, 2007.

- [58] RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, v. 73, p. S21-S29, 2002.
- [59] FERNANDES, F. F.; DIAS, A. L.; RAMOS, C. L.; IKEGAKI, M.; SIQUEIRA, A. M.; FRANCO, M. C. The in vitro antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 49, p. 93-95, 2007.
- [60] AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 215-220, 2007.
- [61] NAITO, Y.; YASUMURO, M.; KONDOU, K.; OHARA, N. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 452-456, 2007.
- [62] AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K. S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 7286-7292, 2004.
- [63] PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as de main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 1100-1103, 2004.
- [64] RUSSO, A.; CARDILEW, V.; SANCHEZ, F.; TRONCOSO, N.; VANELLA, A.; GARBARINO, J. A. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*, v. 76, p. 545-558, 2004.
- [65] SIMÕES, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 59-65, 2004.
- [66] SILVA FILHO, A. A.; BUENO, P. C. P.; GREGÓRIO, L. E.; SILVA, M. L. A.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J. K. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56, p. 1195-1199, 2004.
- [67] MARCUCCI, M. C.; BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Current Topics in Phytochemistry*, v. 2, p. 115-121, 1999.
- [68] PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2502-2506, 2002.

- [69] PARK, Y. K.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K.; DAUGSCH, A.; SATO, H. H.; PASTORE, G; M. Suppressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 10306-10309, 2005.
- [70] MISSIMA, F.; SILVA FILHO, A. A.; NUNES, G. A.; BUENO, P. C.; DE SOUSA, J. P.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 59, p. 463-468, 2007.
- [71] DE FUNARI, C. S.; DE OLIVEIRA FERRO, V.; MATHOR, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 206-212, 2007.
- [72] LEMOS, M.; DE BARROS, M.P.; SOUSA, J. P.; SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; DE ANDRADE, S. F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 59, p. 603-608, 2007.
- [73] SFORCIN, J.M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 301-305, 2005.
- [74] LEITÃO, D. P. S.; SILVA FILHO, A. A.; POLIZELLO, A. C. M.; BASTOS, J. K.; SPADARO, A. C. C. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, p. 1834-1839, 2004.
- [75] VERDI, L. G.; BRIGHENT, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, v. 28, p. 85-94, 2005.
- [76] RESENDE, F.A.; BARCALA, C. A. M. A.; FARIA, M. C. S.; KATO, F. H.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. *Life Sciences*, v. 79, p. 1268-1273, 2006.
- [77] TAVARES, D. C.; LIRA, W. M.; SANTINI, C. B.; TAKAHASHI, C. S.; BASTOS, J. K. Effects of propolis crude hydroalcoholic extract on chromosomal aberrations induced by Doxorubicin in rats. *Planta Medica*, v. 73(15), p. 1531-1536, 2007.
- [78] MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TIA, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, v. 189, p.103-112, 1987.

- [79] MACGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GOULD, D. H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*, v. 2, p. 509-514, 1980.
- [80] MERSCH-SUNDERMANN, V.; KASSIE, F.; BÖHMER, S.; LU, W. Q.; WOHLFAHRTH, R.; SOBEL, R.; BRUNN, H. E.; ELSOHLY, M. A.; ROSS, S. A.; STAHL, T. Extract of *Toxicodendron quercifolium* caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CD1 mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 1611-1617, 2004.
- [81] WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; Brockman, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research*, v. 238, p. 57-85, 1990.
- [82] TAVARES, D. C.; MAZZARON BARCELOS, G. R.; SILVA, L. F.; CHACON TONIN, C. C.; BASTOS, J. K. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in vitro*, v. 20(7), p. 1154-1158, 2006.
- [83] SAVAGE, J. R. K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics*, v. 12, p. 103-122, 1975.
- [84] CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutation Research*, v. 278, p. 83-89, 1992.
- [85] RESENDE, F. A.; ALVES, J. M.; MUNARI, C. C.; SENEDESE, J. M.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 634, p. 112-118, 2007.
- [86] KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, v. 455, p. 155-166, 2000.
- [87] WAKATA, A.; MIYAMAE, Y.; SATO, S.; SUZUKI, T.; MORITA, T.; ASANO, N.; AWOGI, T.; KONDO, K.; HAYASHI, M. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th Collaborative Study by CSGMT/JEMS MMS. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 32, p. 84-100, 1998.
- [88] FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Anticancer drugs: an underestimated risk or an underutilised resource in mutagenesis? *Mutation Research*, v. 331, p. 1-26, 1995.
- [89] CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test). Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse

peripheral blood micronucleus test. (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan). *Mutagenesis*, v. 10, p. 153-159, 1995.

[90] AU, W. W.; HSU, T. C. The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mutation Research*, v. 79, p. 351-361, 1980.

[91] GALLOWAY, S. M.; SOFUNI, T.; SHELBY, M. D.; THILAGAR, A.; KUMAROO, V.; KAUR, P.; GULATI, D.; PUTMAN, D. L.; MURLI, H.; MARSHALL, R.; TANAKA, N.; ANDERSON, B.; ZEIGER, E.; ISHIDATE, M. Jr. Multilaboratory comparison of *in vitro* tests for chromosome aberrations in CHO and CHL cells tested under the same protocols. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 29 (2), p. 189-207, 1997.

[92] MILLER, B.; ALBERTINI, S.; LOCHER, F.; THYBAUD, V.; LORGE, E. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, v. 392 (1-2), p. 45-59, 1997.

[93] HILLIARD, C. A.; ARMSTRONG, M. J.; BRADT, C. I.; HILL, R. B.; GREENWOOD, S. K.; GALLOWAY, S. M. Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 31 (4), p. 316-326, 1998.

[94] HILLIARD, C.; HILL, R.; ARMSTRONG, M.; FLECKENSTEIN, C.; CROWLEY, J.; FREELAND, E.; DUFFY, D.; GALLOWAY, S. M. Chromosome aberrations in Chinese hamster and human cells: a comparison using compounds with various genotoxicity profiles. *Mutation research*, v. 616 (1-2), p. 103-118, 2007.

[95] KEIZER, H. G.; PINEDO, H. M.; SCHUURHUIS, G. J.; JOENJE, H. Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 47, p. 219-231, 1990.

[96] SINGAL, P. K.; LI, T.; KUMAR, D.; DANELISEN, I.; ILISKOVIC, N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 207 (1-2), p. 77-86, 2000.

[97] JUNG, K.; RESZKA, R. Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines. *Advanced drug delivery reviews*, v. 49 (1-2), p. 87-105, 2001.

[98] ELIOT, H.; GIANNI, L.; MYERS, C. Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron complex. *Biochemistry*, v. 23, p. 928-936, 1984.

- [99] CUMMINGS, J.; WILLMOTT, N.; HOEY, B. M.; MARLEY, E. S.; SMYTH, J. F. The consequences of doxorubicin quinone reduction *in vivo* in tumour tissue. *Biochemical Pharmacology*, v. 44 (11), p. 2165-2174, 1992.
- [100] HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, v. 344, p. 721-724, 1994.
- [101] LUNEC, J.; HOOLLOWAY, K. A.; COOKE, M. S.; FAUX, S.; GRIFFITHS, H. R.; EVANS, M. D. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair *in vivo*? *Free Radical Biology and Medicine*, v. 33, p. 875-885, 2002.
- [102] KAUL, N.; SIVESKI-LLISKOVIC, N.; HILL, M.; SLEZAK, J.; SINGAL, K. Free radicals and the heart. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 30, p. 55-67, 1993.
- [103] DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 47-95, 2002.
- [104] TAPIA, A.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C.; LOPEZ, S.; FERESIN, G. E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95, p. 155-161, 2004.
- [105] URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, v. 33, p. 55-64, 2000.
- [106] MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; RODRIGUEZ TALOU, J.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. *Journal of Ethnopharmacological*, v. 58, p. 157-163, 1997.
- [107] LAS HERAS, B.; SLOWING, K.; BENEDÍ, J.; CARRETERO, E.; ORTEGA, T.; TOLEDO, C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M. J.; GÓMEZ-SERRANILHOS, P.; LISO, P. A.; VILLAR, A.; CHIRIBOGA, X. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacological*, v. 61, p. 161-166, 1998.
- [108] NAKANISHI, I.; UTO, Y.; OHKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.; UEDA, J.; OZAWA, T.; FUKUHARA, K.; FUKUZUMI, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 1, p. 1452-4, 2003.
- [109] SHIMIZU, K.; DAS, S. K.; BABA, M.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Dietary artemillin C suppresses the formation of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in mouse colon. *Cancer Letters*, v. 240, p. 135-142, 2006.

- [110] CHATTERJEE, A.; RAMAN, M. J. Protective effect of cysteine against X-ray- and bleomycin-induced chromosomal aberrations and cell cycle delay. *Mutation Research*, v. 290, p. 231-238, 1993.
- [111] VON BORSTEL, R. C.; HIGGINS, J. A. Janus carcinogens and mutagens. *Mutation Research*, v. 402, p. 321-329, 1998.
- [112] HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 81, p. 268-276, 2005.
- [113] FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, v. 475, p. 89-111, 2001.