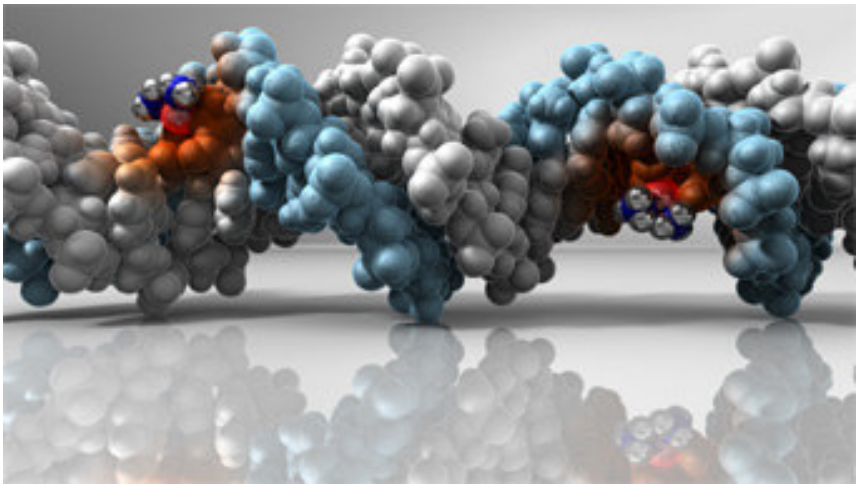
Graciela Cristina dos Santos

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO URUCUM E DA BIXINA SOBRE A GENOTOXICIDADE INDUZIDA PELO ANTITUMORAL CISPLATINA EM CÉLULAS DA LINHAGEM PC12



Araraquara

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNESP

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO URUCUM E DA BIXINA SOBRE A GENOTOXICIDADE INDUZIDA PELO ANTITUMORAL CISPLATINA EM CÉLULAS DA LINHAGEM PC12

Graciela Cristina dos Santos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição como requisito à obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição - Área de Ciências Nutricionais.

Orientadora: Profª Drª Maria de Lourdes Pires Bianchi
Co-Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Araraquara - SP
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Graciela Cristina dos Santos

Avaliação do efeito protetor do urucum e da bixina sobre a genotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina em células da linhagem PC12.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição para a obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição, área de Ciências Nutricionais.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi (orientadora)
Assinatura_____

Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori
Assinatura_____

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Assinatura_____

Profa. Dra. Cecília Rodrigues Silva
Assinatura_____

Prof. Dr. João Bosco Faria
Assinatura_____

Defendida e aprovada pela comissão julgadora em: _____

Dedicatória

Eu amorosamente dedico esta tese à minha mãe Fátima, ao meu pai Dito, ao meu irmão Leonardo e ao meu querido Rafael.

Obrigada a todos os que me apoiaram ao longo deste enorme caminho... o apoio incondicional dos que nos rodeiam é o mais importante da vida!

"Os obstáculos existem por algum motivo. Não estão ali para nos impedir de entrar. Eles existem para nos dar uma chance de mostrarmos a força de nossas aspirações."

Agradecimentos

Primeiro, eu gostaria de agradecer a minha orientadora, Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi, por me mostrar o caminho a seguir e me dar o apoio necessário durante o meu doutorado. Agradeço a simpatia com a qual me recebeu em seu grupo. Exemplo de profissionalismo, ética e sensatez.

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos, meu co-orientador da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, por suas valiosas assessorias e atenção dispensada durante o meu doutorado.

Além disso, agradeço a Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes, do laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, pela amizade e apoio presentes no nosso convívio diário no laboratório. Por ter contribuído para a minha formação e por ter abraçado este trabalho quando ainda era um projeto de pesquisa.

Todo o amor do meu coração vai para a minha família por todo o apoio durante a minha vida. Eu gostaria de expressar meu agradecimento especial aos meus pais, Dito e Fátima, que me

ensinaram os valores da vida. Por seu amor, por sempre estarem presentes, apoiando-me e me fazendo sentir segura. Eu também gostaria de agradecer ao meu irmão Leonardo que sempre foi uma grande benção para mim.

Eu agradeço a todos os membros do nosso grupo por suas discussões e ajuda. Sem dúvida aqui não teria chegado se não tivesse encontrado pessoas maravilhosas no nosso laboratório de Bromatologia e Nutrigenômica, que me ajudaram tecnicamente, e também pessoalmente. Agradeço especialmente as técnicas e especialistas, Joana D'Arc C. Darin, Regislaine Valéria Burin e Natalia Koyama.

Eu tive o privilégio de ter muito amigos durante a realização do meu doutorado na USP de Ribeirão Preto. Aqui, eu gostaria de expressar a minha satisfação em ter suas amizades e o meu desejo de que os nossos laços permaneçam para sempre. Um grande abraço aos meus queridos amigos Estela Beatriz Behling, Cátia Lira do Amaral, Alessandro de Oliveira Rios, Leonardo Meneghin Mendonça, Gilmara Ausech Antonucci, Eliziani Mieko Konta, Rafaela de Barros e Lima Bueno, Juliana Carvalho Ribeiro, e Alexandre Ferro Aissa.

Com eles aprendi...

Aprendi com o Ale o valor da dedicação em tudo o que se faz, com a Eli que é possível conciliar trabalho com alegria, com a Cátia que é sempre possível ajudar alguém mesmo quando se está mergulhado em um mar de trabalho, com a Rafa que as coisas não são tão ruins como parecem, com a Ju que tudo o que é nosso está guardado, com a Estela que bom gosto também é importante, com o Léo aprendi o jeitinho mineiro de ser, e com o Xandão a generosidade de ajudar a quem mal se conhece. Tenho absoluta certeza de que sentirei muitas saudades de todos!

Em especial gostaria de agradecer duas amigas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP, Raquel Bedani e Roseli, com as quais vivi momentos inesquecíveis que levarei para sempre.

Não poderia deixar de agradecer imensamente à minha amiga e grande pesquisadora Dra. Gilmara Ausech Antonucci. A sua presença constante durante o meu doutorado foi imprescindível para que tudo se realizasse. Agradeço por todos os ensinamentos e ajuda, mas principalmente por ter hoje a sua amizade!

Esse sentimento de "muito obrigada por ter cruzado o meu caminho" também é para o meu amigo e hoje Prof. Dr. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Alessandro de Oliveira Rios, uma pessoa especial que me ajudou muito durante o doutorado, mesmo estando distante. Nunca me esquecerei de você, da sua garra, e dos bons momentos ao seu lado. Valeu a pena!!

Gostaria de agradecer a todos do laboratório de Toxicologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP/USP pela disposição em ensinar e pela doação da linhagem celular PC12 ao nosso laboratório.

Também gostaria de agradecer a todos do laboratório de Citogenética Molecular e Mutagênese do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. Um agradecimento especial às Profas. Dras. Catarina Satie Takahashi e Elza Tiemi Sakamoto Hojo por terem gentilmente cedido o microscópio de epi-fluorescência necessário para minhas análises, e à Dra. Raquel Alves dos Santos pelos ensinamentos e treinamentos proferidos na técnica do cometa, e por ter sido tão solícita em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporini Lopes e ao técnico especialista José Carlos Tomás, do laboratório de Química Orgânica da FCFRP/USP, pelas análises cromatográficas das minhas amostras.

Gostaria de agradecer à Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, à Profa. Dra. Cecília Rodrigues Silva, ao Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios e ao Prof. Dr. João Bosco Faria por terem aceitado fazer parte da minha banca examinadora e contribuírem com meu trabalho de doutorado.

Também gostaria de agradecer a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP por ter me acolhido com tanto carinho e possibilitado o desenvolvimento do meu trabalho de doutorado em suas dependências.

A todos aqueles que passaram por minha vida deixando um pouquinho de si e levando um pouquinho de mim, fica aqui expressa toda a minha gratidão.

"A ciência não é, e nunca será, um livro terminado. Todo progresso importante levanta novas questões. Dificuldades novas e mais profundas são reveladas posteriormente a cada desenvolvimento."

Albert Einstein

Sumário

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas i
Lista de Figuras ii
Lista de Tabelas iv
Resumo vi
Abstract ix

1 INTRODUÇÃO
1.1 Cisplatina 02
1.1.1 História 03
1.1.2 Mecanismos de ação da cisplatina 04
1.1.2.1 Etapas do mecanismo de ação da cisplatina 07
1.1.2.1.1 Acúmulo celular de cisplatina 07
1.1.2.1.2 Hidrólise da cisplatina 08
1.1.2.1.3 Ligação ao DNA e outros alvos celulares 09
1.1.3 Limitações no uso e danos neurotóxicos induzidos pela cisplatina ... 09
1.2 Antioxidantes 13
1.3 Urucum e Bixina 16
1.4 Avaliação de danos ao DNA 18

2 OBJETIVOS
2.1 Objetivo Geral 26
2.2 Objetivos específicos 26

3 MATERIAL E MÉTODOS
3.1 Material 28
3.1.1 Obtenção e cristalização da bixina 28
3.1.2 Linhagem celular e condições de cultura. 29
3.2 Métodos 30
3.2.1 Protocolo experimental 30
3.2.2 Avaliação da viabilidade celular 31
3.2.3 Teste do micronúcleo 32
3.2.4 Análise de eletroforese em gel de célula única (Ensaio Cometa) 35

3.3. Grupos Experimentais 37
3.4 Análise Estatística 39

4 RESULTADOS
4.1 Cisplatina 41
4.1.1 Viabilidade celular 41
4.1.2 Micronúcleo 42
4.2 Urucum 46
4.2.1 Avaliação citotóxica e genotóxica 46
4.2.2 Avaliação antigenotóxica 50
4.3 Bixina 54
4.3.1 Avaliação citotóxica e genotóxica 54
4.3.2 Avaliação antigenotóxica 59
4.4 Análise comparativa entre o urucum e a bixina 63
4.4.1 Genotoxicidade do urucum e da bixina 63
4.4.2 Antigenotoxicidade do urucum e da bixina 65

5. DISCUSSÃO 67

6. CONCLUSÕES 87

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89

ANEXOS 106

LISTA DE ABREVIATURAS

%DNA	Porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides
%BN	Porcentagem de células binucleadas
ATCC	“American Type Culture Collection”
BN	Células binucleadas
CAS	“Chemical Abstract Service”
cDDP	Cisplatina
Cit-B	Citocalasina-B
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
IPBC	Índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese
MN	Micronúcleo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OTM	“Olive tail moment”
PC12	Linhagem celular de feocromocitoma de rato
RNA	Ácido ribonucléico
TM	“Tail moment”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da cisplatina. 03

Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação da cisplatina.. 05

Figura 3. Formação e efeito dos adutos da cDDP..... 06

Figura 4. A via de ação da cisplatina na célula. 08

Figura 5. Toxicidades associadas ao tratamento com cisplatina..... 10

Figura 6. Fotos de urucum 16

Figura 7. Estrutura da bixina 17

Figura 8. Esquema simplificado da extração e cristalização da bixina..... 29

Figura 9. Microfotografia de células PC12 obtidas na análise de MN 34

Figura 10. Microfotografia de um nucleóide íntegro (A) e em forma de cometa com diferentes intensidades de danos (B) obtido pelo Ensaio Cometa em células PC12. 37

Figura 11. Avaliação do efeito citotóxico da cisplatina em células PC12. 42

Figura 12. Índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células PC12 tratadas com cisplatina. 44

Figura 13. Indução de micronúcleos pela cisplatina em células PC12..... 44

Figura 14. Avaliação do efeito citotóxico do urucum em células PC12 46

Figura 15. Índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células PC12 tratadas com urucum 48

Figura 16. Avaliação do pré-tratamento com diferentes concentrações de urucum (0,2 a 4,0 µg/mL) 1 hora antes do tratamento com 0,1µg/mL de

cisplatina em células PC12 51

Figura 17. Avaliação do efeito citotóxico de concentrações inicialmente testadas de bixina em células PC12 (entre 1,0 e 20,0 µg/mL) 55

Figura 18. Avaliação do efeito citotóxico da bixina em células PC12. 55

Figura 19. Índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células PC12 tratadas com bixina 57

Figura 20. Avaliação do efeito citotóxico do pré-tratamento com diferentes concentrações de bixina (0,05, 0,08 e 0,10 µg/mL) 1 hora antes do tratamento com 0,1µg/mL de cisplatina em células PC12..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de células de acordo com o número de núcleos em cultura de células PC12 tratadas com diferentes concentrações de cisplatina submetidas ao Teste do Micronúcleo (MN) 43

Tabela 2. Distribuição de células de acordo com o número de núcleos em cultura de células PC12 tratadas com diferentes concentrações de urucum submetidas ao Teste do Micronúcleo (MN) 47

Tabela 3. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células binucleadas (CBN) em células PC12 sem tratamento (controle) e tratadas com urucum em diferentes concentrações 49

Tabela 4. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA) obtidos pelo Ensaio do Cometa em células PC12 sem tratamento (controle) e tratadas com urucum em diferentes concentrações.... 50

Tabela 5. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células PC12 binucleadas (BN) sem tratamento (controle) e pré-tratadas com diferentes concentrações de urucum 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina (cDDP). 52

Tabela 6. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA) obtidos pelo Ensaio do Cometa em células PC12 sem tratamento (controle) e pré-tratadas com diferentes concentrações de urucum 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina (cDDP). 53

Tabela 7. Distribuição de células de acordo com o número de núcleos em cultura de células PC12 tratadas com diferentes concentrações de bixina submetidas ao Teste do Micronúcleo (MN). 56

Tabela 8. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células PC12 binucleadas (BN) sem tratamento (controle) e tratadas com bixina em diferentes concentrações. 58

Tabela 9. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA) obtidos pelo Ensaio do Cometa em células PC12 sem tratamento (controle) e tratadas com bixina em diferentes concentrações 59

Tabela 10. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células PC12 binucleadas (BN) sem tratamento (controle) e pré-tratadas com diferentes concentrações de bixina 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina (cDDP). 61

Tabela 11. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA) obtidos pelo Ensaio do Cometa em células PC12 sem tratamento (controle), e pré-tratadas com bixina em diferentes concentrações 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina (cDDP) 62

Tabela 12. Análise comparativa do urucum e da bixina em relação aos resultados obtidos no Teste do Micronúcleo e no Ensaio do Cometa em células PC12 64

Tabela 13. Análise comparativa dos pré-tratamentos com urucum e com bixina 1 hora antes do tratamento com cisplatina (cDDP) em relação aos resultados obtidos no Teste do Micronúcleo e no Ensaio do Cometa em células PC12 .. 66

Resumo

A neuropatia induzida por drogas quimioterápicas é uma complicação no tratamento do câncer e outras doenças por ser freqüentemente dolorosa e requerer a interrupção da terapia. O antitumoral cisplatina é comumente usado contra muitas formas de câncer há aproximadamente 40 anos. Entretanto, sua aplicação é associada a muitos efeitos tóxicos, como neurotoxicidade, nefrotoxicidade, perda da audição e vômitos. Estes efeitos adversos têm levado ao desenvolvimento de agentes específicos para amenizar a toxicidade do fármaco. Alguns estudos sugerem que a administração de antioxidantes é capaz de reduzir os danos e proteger os tecidos. Dessa forma, os carotenóides são mais uma opção a ser avaliada, pois são considerados eficazes agentes antioxidantes. O urucum é uma fonte natural de corantes vermelhos e além da bixina (fração lipossolúvel do extrato), estão presentes nas suas sementes, outros carotenóides, como a norbixina, o β-caroteno, a criptoxantina, a luteína e a zeaxantina. Neste estudo, foi avaliada a genotoxicidade e a antigenotoxicidade do urucum e da bixina sobre a toxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina em culturas de células PC12. A citotoxicidade foi determinada pelo método do MTT, a frequência de danos cromossômicos pelo Teste do Micronúcleo e a extensão de danos primários ao DNA pelo Ensaio do Cometa. O urucum e a bixina foram avaliados preliminarmente quanto a sua genotoxicidade. O urucum nas concentrações 0,2, 0,5 e 1,0 μg/mL e a bixina nas concentrações 0,05, 0,08 e 0,10 μg/mL não foram citotóxicos e nem genotóxicos às células PC12. Assim, essas concentrações foram utilizadas nos experimentos para verificar a proteção do urucum e da bixina contra os danos induzidos pela cisplatina. Embora o efeito protetor do urucum e da bixina não tenha sido evidente nos resultados obtidos pelo Ensaio do Cometa, eles se mostraram eficazes na inibição dos danos cromossômicos (Teste do Micronúcleo), apresentando proteção às células PC12 entre 66,4 e 76,7% e entre 50,8 e 74,6%, respectivamente. Dessa forma, os resultados indicam que o urucum e a bixina podem ser considerados agentes capazes de prevenir danos mutagênicos induzidos pela cisplatina *in vitro* e também poderiam ajudar na modulação do estresse oxidativo encontrado na quimioterapia com este fármaco. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para melhor entender os mecanismos envolvidos na atividade protetora desses agentes.

Abstract

The neuropathy induced by chemotherapeutic drugs is a complication in the treatment of cancer and other diseases, because it is often painful and requires discontinuation of the therapy. Cisplatin has been commonly used against many forms of cancer for approximately 40 years. However, its application is associated with many toxic effects such as neurotoxicity, nephrotoxicity, hearing loss and vomiting. These adverse effects have led to the development of specific agents to lessen the toxicity of the drug. Some studies have suggested that the administration of antioxidants is able to reduce the damage and protect the tissues. Thus, the carotenoids are one more option to be evaluated, because they are considered to be effective antioxidants. Annatto is a natural source of red dyes and pigments and in addition to bixin (liposoluble fraction of the extract), other carotenoids are present in its seeds, such as norbixin, B-carotene, cryptoxanthin, lutein and zeaxanthin. In the present study, the genotoxicity and antigenotoxicity of annatto and bixin on the cisplatin induced-toxicity in PC12 cell cultures was assessed. Cytotoxicity was determined by the MTT assay, chromosomal damage by the Micronucleus test and the extent of primary damage to the DNA by the Comet assay. Annatto and bixin were first assessed with respect to their genotoxicity. Annatto concentrations of 0.2, 0.5 and 1.0 μg/ml and bixin concentrations of 0.05, 0.08 and 0.10 μg/ml were neither cytotoxic nor genotoxic to the PC12 cells. Thus, these concentrations were used in experiments to verify the protective effect of annatto and bixin against damage induced by cisplatin. Although the protective effect of annatto and bixin was not evident in the results obtained by the Comet assay, effective inhibition of the chromosomal damage (Micronucleus test) induced by cisplatin was shown. Annatto and bixin protected the PC12 cells at levels ranging from 66.4 to 76.7% and from 50.8 to 74.6%, respectively. Thus, the results indicated that annatto and bixin could be considered as agents capable of preventing the mutagenic damage induced by cisplatin *in vitro*, and could also help in modulating the oxidative stress developed during chemotherapy with this drug. However, further studies should be carried out to better understand the mechanisms involved in the activity of these protective agents.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cisplatina

Drogas antineoplásicas são muito utilizadas no tratamento de vários tipos de câncer. A atividade antitumoral de muitos agentes quimioterápicos é particularmente dependente da sua habilidade em induzir danos mutagênicos e clastogênicos ao DNA, incluindo adutos de base, erros de replicação, quebras de fitas e ligações cruzadas (JACKSON, 2002). O objetivo desta terapia é destruir as células tumorais mantendo a integridade das células normais. A diferença entre a quantidade de droga necessária para induzir ação anti-tumoral bem sucedida e a que produz toxicidade em células normais é pequena (SÁNCHES-SUÁREZ et al., 2008).

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina II, cDDP) tem ampla atividade antineoplásica. Ela pode ser usada como agente simples ou em combinação no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo tumores malignos epiteliais, câncer testicular e ovariano avançados, câncer de cabeça e pescoço, bexiga, esôfago e pulmão (ZHANG et al., 2008; WANG, LIPPARD, 2005; FRANCESCATO et al., 2004). O sucesso clínico da cisplatina no tratamento do câncer é bem conhecido, mas seu uso tem sido limitado por efeitos colaterais como neuropatia periférica, nefrotoxicidade, ototoxicidade e resistência adquirida e intrínseca (PANG et al., 2007, ABU-SURRAH, KETTUNEN, 2006). Devido à hiperhidratação, que tem reduzido significativamente a incidência de toxicidade renal, a neurotoxicidade se torna a maior toxicidade dose-limitante (PACE et al., 2003).

A cisplatina é um fármaco que possui um átomo central de platina envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia (Figura 1). Torna-se ativada dentro da célula por substituição dos íons cloreto por moléculas de água e esta forma é muito

reativa nos centros nucleofílicos de biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e membranas fosfolipídicas (CHO et al., 2008, WANG e LIPPARD, 2005, JAMIESON, LIPPARD, 1999). A cisplatina pode existir nas formas *cis* e *trans*, mas somente a configuração *cis* é efetiva. O isômero *trans* não tem bioatividade significativa.

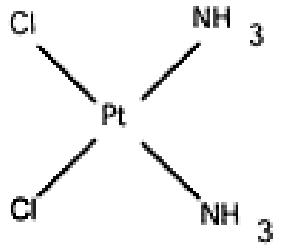


Figura 1. Estrutura química da cisplatina. Apresenta um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos amônia.

1.1.1 História

A descoberta da cisplatina como droga antitumoral tem uma história muito interessante. A cisplatina foi sintetizada em 1845 por Peyrone. Apesar da sua síntese, a estrutura da cisplatina não era conhecida até 1893, quando um químico, Prêmio Nobel, Alfred Werner, explicou sua estrutura em detalhes. Depois disso, a cisplatina não atraiu nenhuma atenção especial até que na década de 60 um professor de física da Universidade de Michigan chamado Barnett Rosenberg descobriu acidentalmente sua atividade biológica (TRIMMER, ESSIGMANN, 1999; ROSENBERG, VANCAMP, KRIGAS, 1965). Rosenberg estava interessado em estudar os efeitos dos campos elétricos e das correntes elétricas no crescimento da bactéria *Escherichia coli*. Por esta razão, ele colocou eletrodos positivos e negativos imersos no meio de cultura da *E. coli*. Muito inesperadamente, ele observou que as células entre os eletrodos de platina cresceram em tamanho, mas não se dividiram (ABU-SURRAH, 2007; TRIMMER, ESSIGMANN, 1999).

Primeiramente, Rosenberg pensou que este efeito pudesse ser apenas devido a presença de campos elétricos no meio de cultura da *E. coli*, mas investigações mais detalhadas revelaram que compostos contendo platina, que foram produzidos pela reação do eletrodo de platina com a solução de NH_4Cl na presença de luz e corrente elétrica, eram responsáveis pela inibição da divisão da *E. coli* (LIPPERT, 1999). Para confirmar esta hipótese, Rosenberg e colaboradores aplicaram os seus recém-descobertos compostos de platina em alguns tipos de tumores de ratos (ROSENBERG, VANCAMP, 1970). Vários compostos foram usados durante a eletrólise e a cisplatina mostrou-se mais efetiva na capacidade de dificultar a divisão celular. Portanto, o efeito inibitório da cisplatina sobre a divisão celular sugeriu que a cisplatina pudesse ter características potenciais de um agente antineoplásico (TRIMMER, ESSIGMANN, 1999; ROSENBERG, VANCAMP, KRIGAS, 1965).

Esta pesquisa, primeiro publicada na Nature em 1969 (ROSENBERG et al., 1969) foi um grande avanço na história das drogas quimioterápicas. A Fase I dos ensaios clínicos da cisplatina em humanos começou em 1971 e a cisplatina foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 1978 com o nome de Platinol para tratamento de câncer testicular e de ovário (WEISS, CHRISTIAN, 1993; HIGBY et al., 1974).

1.1.2 Mecanismos de ação da cisplatina

Ao longo dos últimos trinta anos, grandes esforços têm sido direcionados para investigar a forma como a cisplatina exerce os seus efeitos sobre as células, a fim de entender as razões das suas propriedades farmacológicas e tóxicas, e para fornecer orientação para o desenvolvimento de novas drogas. Muitas descobertas surgiram, e

os passos que agora acreditam estar envolvidos no mecanismo de ação da cisplatina são apresentados na Figura 2 (BARNES, LIPPARD, 2004).

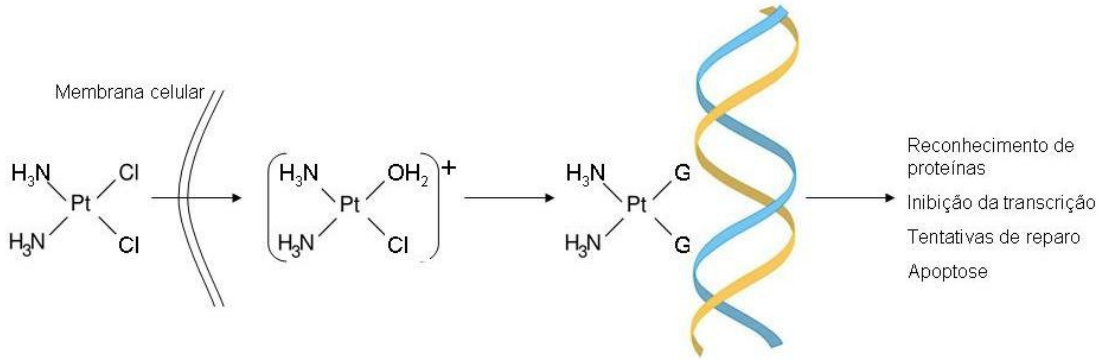


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação da cisplatina. Adaptado de BARNES, LIPPARD, 2004.

Por muitos anos tem sido aceito que o complexo neutro da cisplatina entra nas células por difusão passiva. Entretanto, relatórios recentes fornecem evidências de um mecanismo de transporte ativo. Ao entrar na célula, a concentração dos íons cloreto está substancialmente mais baixa que aquela encontrada no soro, causando rápida hidrólise dos íons cloreto da cisplatina, deixando a platina disponível para qualquer ligação a bases que possam estar presentes. O DNA é conhecido ser o alvo biológico primário da cisplatina (NITISS, 2002) e estudos comprovaram isso ao mostrar que as células deficientes no reparo do DNA são hipersensíveis à cisplatina (POPOFF, BECK, RUPP, 1987; BROUWER et al., 1981).

Portanto, a atividade antitumoral da cisplatina acredita-se resultar das interações com o DNA. Sua citotoxicidade é atribuída a formação de adutos de Pt-DNA através da adição de platina na posição N7 das bases de guanina no DNA (Figura 3), originando ligações cruzadas intracadeias 1,2-d(GpG) – adutos entre guaninas adjacentes – e 1,2-d(ApG) – adutos entre adenina e guanina adjacentes –

e também ligações intercadeias – adutos ligando as duas cadeias da dupla hélice do DNA (Figura 3) (WOZNIAK, CZECHOWSKA, BLASIAK, 2004, RAJSKI, WILLIAMS, 1998). Os adutos formados interferem com a duplicação do DNA pelo bloqueio da enzima DNA polimerase, inibem a transcrição do RNA, resultando em bloqueio do ciclo celular e ativação das vias de sinalização da apoptose, e também a tradução e o reparo do DNA (CHO et al., 2008; NADIN et al., 2006; WOZNIAK, CZECHOWSKA, BLASIAK, 2004). Devido à formação das ligações cruzadas intracadeias, intercadeias e DNA-proteína, o DNA danificado torna-se incapaz de replicar (COOLEY et al., 1994; EASTMAN, 1987).

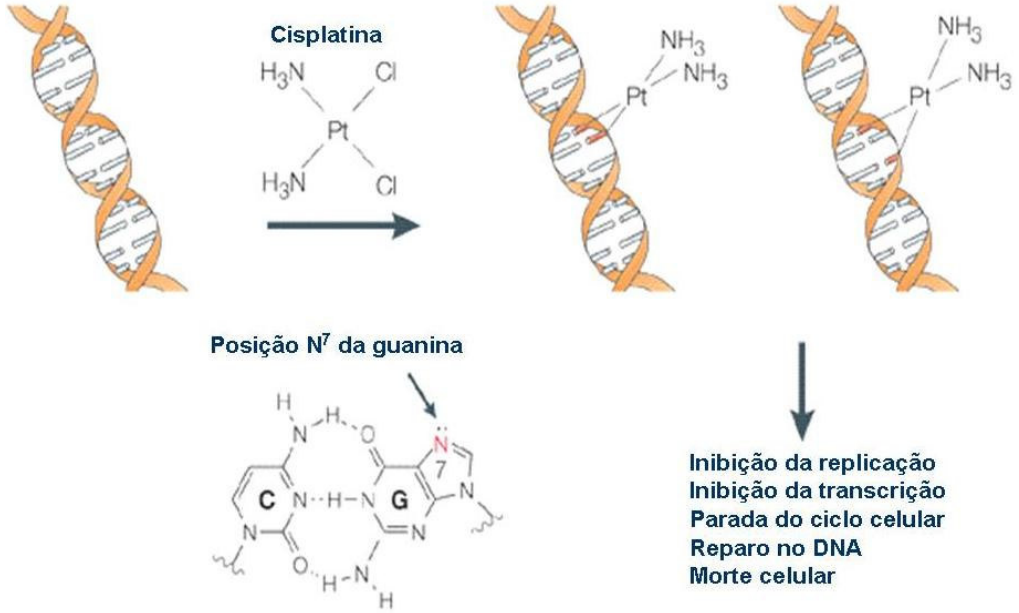


Figura 3. Formação e efeito dos adutos da cDDP. O átomo de platina da cDDP se liga covalentemente a posição N^7 das purinas. Os adutos DNA-cDDP causam várias respostas celulares como: inibição da replicação celular, inibição de transcrição, parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (WANG; LIPPARD, 2005).

Estudos *in vitro* verificaram que as ligações da cisplatina com o DNA formam entre 60-65% de adutos do tipo ligações cruzadas intracadeias 1,2-d(GpG) e 20-25% do tipo ligações cruzadas intracadeias 1,2-d(ApG). Juntos, estes são responsáveis por 90% do total de adutos formados. Os outros 10% dos adutos são formados por ligações cruzadas intracadeias 1,3, ligações cruzadas intercadeias e ligações cruzadas proteína-DNA (AUGE, KOZELKA, 1997; FICHTINGER-SCHEPMAN et al., 1985).

Há ainda uma discussão sobre quais tipos de adutos cisplatina-DNA são mais importantes na mediação da citotoxicidade da cisplatina. No entanto, cada vez mais evidências indicam os adutos intracadeias como os principais responsáveis pela ação citotóxica da cisplatina (SIDDIK, 2002).

1.1.2.1 Etapas do mecanismo de ação da cisplatina

Embora tenha ocorrido muito progresso para se entender o modo de ação da cisplatina e os mecanismos envolvidos na sua atividade antitumoral, o conhecimento disponível sobre os mecanismos de ação da droga permanece incompleto (JAMIESON, LIPPARD, 1999). O que está claro é que o alvo primário da cisplatina é o DNA, preferencialmente a posição N7 das bases de guanina (BAIK, FRIESNER, LIPPARD, 2003). O caminho percorrido pela cisplatina após entrar na célula é descrito a seguir:

1.1.2.1.1 Acúmulo celular de cisplatina

A cisplatina é administrada nos pacientes através de injeção intravenosa. Sendo uma molécula neutra, ela pode se difundir rapidamente nas células por difusão passiva (GATELY, HOWELL, 1993). É também transportada para dentro e

fora das células por difusão ativa (CEPEDA et al., 2007; BOSE, 2002). A perda dos íons cloreto facilita sua ligação ao DNA. As etapas envolvidas na ligação da cisplatina com o DNA a partir da entrada na célula e a hidrólise no interior da célula seguida por sua ligação com as bases no DNA são apresentadas na Figura 4.

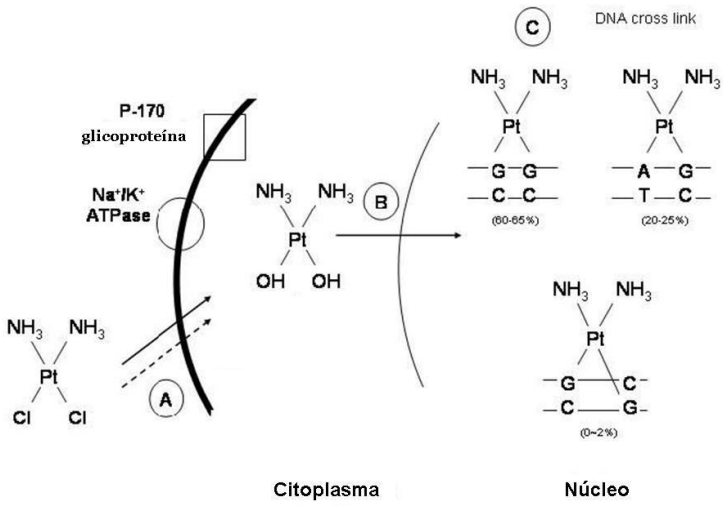


Figura 4. A via de ação da cisplatina na célula. A (entrando na célula), B (no citoplasma), C (no núcleo). (GUMINSKI, HARNETT, DEFAZIO, 2002; LLOYD, KELLAND, 1999).

1.1.2.1.2 Hidrólise da cisplatina

Acredita-se que a hidrólise da cisplatina seja o passo chave na ativação da molécula para sua ligação com alvos celulares, incluindo o DNA (MILLER, HOUSE, 1991). Apesar da cisplatina permanecer neutra no plasma sanguíneo, perda substancial de platina ainda ocorre devido a reação da cisplatina com proteínas e enzimas extracelulares (BOSE, 2002). Dentro da célula, os íons cloro da cisplatina podem ser substituídos pela água (Figura 4B).

1.1.2.1.3 Ligação ao DNA e outros alvos celulares

Apesar de apenas 1% das moléculas de cisplatina se ligarem ao DNA (HO, AU-YEUNG, TO, 2003; PEREZ, 1998), a ligação entre a cisplatina e o DNA nos núcleos celulares parece ser responsável, em grande parte, por suas propriedades antitumorais (GONZALEZ et al., 2001). Estudos de cristalografia por raios X mostram que a posição N7 dos anéis imidazólicos das bases de purinas do DNA (especificamente guanina) são os locais mais favorecidos para a ligação do DNA com a cisplatina (TAKAHARA et al., 1995).

1.1.3 Limitações no uso e danos neurotóxicos induzidos pela cisplatina

Na prática clínica, o uso da cisplatina é limitado devido aos seus efeitos adversos como nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, mielossupressão, efeitos gastrintestinais e mutagênese (WEIJL, CLETON, OSANTO, 1997). Estas toxicidades são dose-dependentes, limitando a terapia e a dose máxima tolerada. Para a cisplatina, a dose máxima tolerada está entre 100 e 120 mg/m^2 (I.V.) ou entre 2,5 e 3,0 mg/Kg (I.V.) por ciclo e deve ser administrada com pré- e pós-hidratação adequada (HARTMANN, LIPP, 2003; MARKMAN, 2003). A concentração normalmente encontrada no plasma de pacientes tratados com cisplatina é de 35 μM (Dimanche-Boitrel et al., 2005). Entretanto, overdoses acidentais de cisplatina podem ocorrer. Embora a reação à quimioterapia seja diferente de paciente para paciente, quase todos os indivíduos que são tratados com cisplatina apresentam problemas gastrintestinais.

A Figura 5 resume os principais efeitos colaterais tóxicos da cisplatina.

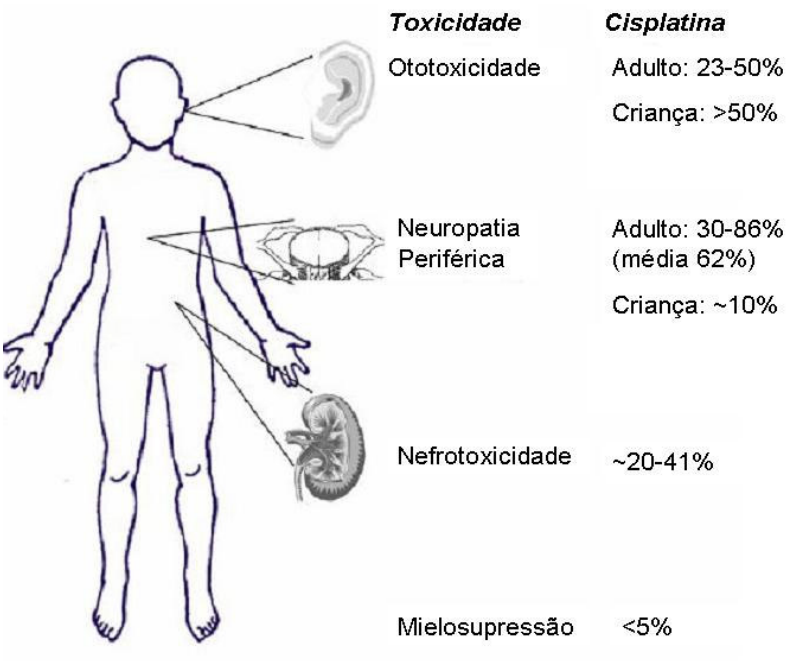


Figura 5. Toxicidades associadas ao tratamento com cisplatina (RABIK, DOLAN, 2007).

A resistência aos medicamentos é um grande problema no tratamento quimioterápico do câncer (OHMICHI et al., 2005). A cisplatina não é exceção – algumas células tumorais (ex. células de melanoma) são intrinsecamente resistentes à cisplatina, enquanto que outras (ex. células de câncer de ovário) desenvolvem resistência devido ao uso repetido (FRAM, 1992). Embora os mecanismos exatos de resistência não sejam conhecidos, acredita-se que a resistência à cisplatina possa ser associada com um ou mais dos seguintes procedimentos: 1) reduzir a absorção celular, 2) desativação aumentada dentro da célula antes da ligação com o DNA e 3) aumento no reparo do DNA (OHMICHI et al., 2005).

A utilização da cisplatina proporciona queda nos níveis de antioxidantes séricos, que podem refletir falência do mecanismo de defesa contra a lesão oxidativa induzida por drogas antineoplásicas (WEIJL et al., 1998). É capaz de gerar espécies

reativas de oxigênio como o radical superóxido e o radical hidroxila, e vários efeitos tóxicos da cisplatina estão associados à produção de radicais livres pela interação com o DNA e pela peroxidação lipídica. A indução do estresse oxidativo pela geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) provoca um desbalanço pró-oxidante e antioxidante na célula podendo culminar na morte celular (MASUDA, TANAKA, TAKAHAMA, 1994). Devido ao fato dos quimioterápicos não serem seletivos, as células normais também são afetadas, ocorrendo complicações como as toxicidades.

Muitas drogas citotóxicas utilizadas no tratamento do câncer causam significante neurotoxicidade dose-limitante (QUASTHOFF, HARTUNG, 2002). A neurotoxicidade é um dos efeitos colaterais dose-limitante bem conhecido da cisplatina. A neurotoxicidade tipicamente se apresenta como uma neuropatia sensorial dolorosa que pode tornar necessária a diminuição da dose da droga ou o término do tratamento, podendo diminuir a chance de cura do paciente. A incidência de neuropatia é encontrada em cerca de 49-92% dos pacientes, sendo mais comum a neuropatia periférica (COOLEY et al., 1994). A neuropatia periférica geralmente progride por meses depois do final do tratamento, e os sinais e sintomas clínicos não são freqüentemente reversíveis podendo afetar significativamente a qualidade de vida do paciente (PACE et al., 2003).

Atualmente a neuropatia sensorial periférica é considerada o maior efeito colateral dose limitante do tratamento com a cisplatina (GOLDEN, JOHNSON, 2004; JIRSOVA et al., 2006). Aproximadamente 20% dos pacientes são incapazes de completar um curso completo da terapia com cisplatina devido à neuropatia sensorial (MCDONALD, SOHAL, FORSTER, 2005a). Essa neuropatia é caracterizada por queixas inicialmente de parestesia nas extremidades distais, que pode progredir

para grave ataxia sensorial (MCCARRON et al., 1999; GILL, WINDEBANK, 1998). Neurônios e células de Schwann são diretamente afetados pela cisplatina (JIRSOVA et al., 2006).

Exames neurológicos e neurofisiológicos revelam que todos os pacientes que receberam tratamento usando cisplatina com doses cumulativas maiores que 300 mg/m^2 (I.V.) desenvolveram sinais de neurotoxicidade, que é comumente irreversível (QUASTHOFF, HARTUNG, 2002; ALBERTS, NOEL, 1995). O mecanismo da neurotoxicidade induzida pela cisplatina não está plenamente conhecido, mas o envolvimento seletivo de grandes fibras sensoriais mielinizadas sugere que pode derivar de danos no gânglio da raiz dorsal (CAVALETTI, et al., 1992). Também foi observada a indução de adutos em células da linhagem PC12 (MCDONALD et al., 2005b) e exames farmacológicos do tecido neural de pacientes tratados com cisplatina têm mostrado acúmulo de platina no gânglio da raiz dorsal que não está protegido pela barreira sangue-cérebro (KRARUP-HANSEN, RIETZ, KRARUP, 1999; GREGG et al., 1992).

A linhagem celular PC12 foi desenvolvida de células de feocromocitoma da glândula adrenal de ratos, e tem sido frequentemente utilizada com sucesso para o estudo das funções neuronais (PIGA et al., 2007). Com relação aos estudos neuronais, as células PC12 possuem várias vantagens sobre as culturas de células neuronais primárias, incluindo a homogeneidade da população celular (COLOGNATO et al., 2006). Estas células possuem características neuronais que incluem: síntese, armazenamento e excreção de noradrenalina e dopamina, a presença dos receptores nicotínicos de acetilcolina, do ácido gama-aminobutírico (GABA), da colina acetiltransferase e da tirosina hidroxilase (GARTLON et al., 2006).

Pesquisas indicam que a terapia nutricional pode exercer grandes benefícios ao tratamento oncológico por meio da minimização dos efeitos adversos produzidos pelo tratamento antineoplásico, promovendo um melhor estado de saúde ao paciente. Estes efeitos adversos têm levado ao desenvolvimento de agentes específicos para amenizar ou eliminar a toxicidade da cisplatina. Alguns estudos sugerem que a administração de antioxidantes é capaz de reduzir danos e proteger os tecidos (ANTUNES, BIANCHI, 2004; NISHIKAWA et al., 2001; LIU, BALIGA, 2000; WEIJL, CLETON, OSANTO, 1997; APPENROTH et al., 1997; BRAUNLICH, APPENROTH, FLECK, 1997; SUGIHARA, GEMBA, 1986). Os antioxidantes impedem, através de sua própria redução, o dano oxidativo celular e minimizam a toxicidade causada pelos radicais livres (KONG, LILLEHEI, 1998).

1.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (MAXWELL, 1995; SIES, 1993).

A administração de antioxidantes não parece interferir no efeito antitumoral dos antineoplásicos, pois estes fármacos eliminam as células cancerosas por meio de outros mecanismos celulares que não envolvem a ação das espécies reativas de oxigênio (ROS). Portanto, os antioxidantes da dieta poderiam atuar como quimioprotetores, prevenindo contra os efeitos colaterais das ROS – que podem causar danos a proteínas (GRACY et al., 1999), lipídeos (FRAGA et al., 1987) e ácidos nucléicos (RICHTER, PARK, AMES, 1988) – e o desenvolvimento de cânceres secundários, relacionados com as mutações induzidas pelo estresse oxidativo no DNA (ANTUNES, BIANCHI, 2004; ELSENDOORN et al., 2001).

As interações entre antineoplásicos e antioxidantes promovem a potencialização do mecanismo de ação das drogas, resultando em diminuição do tamanho do tumor com produção de menores efeitos colaterais, melhoria da qualidade de vida dos pacientes oncológicos e maior tempo de sobrevida (LAMSON, BRIGNALL, 1999; WEIJL et al., 1998).

Alguns compostos derivados de plantas podem ser utilizados como agentes antimutagênicos (HAYDER et al., 2008; CALOMME et al., 1996) e antioxidantes (BEN AMMAR et al., 2007; YAGI et al., 2002). Estas substâncias podem ser úteis na prevenção do câncer e outras doenças relacionadas com mutação por fortalecer os mecanismos de defesa fisiológicos, ou atuar como fatores de proteção (DE FLORA, BRONZETTI, SOBELS, 1992).

Nos últimos anos, muitos agentes neuroprotetores foram investigados com o objetivo de reduzir o efeito da neurotoxicidade periférica. Em busca de uma alternativa viável para o tratamento adjuvante com a cisplatina, os carotenóides são mais uma opção a ser avaliada.

Os carotenóides são compostos pigmentados lipossolúveis, encontrados principalmente em frutas e vegetais, que constituem as principais fontes de carotenóides na dieta humana. Estes são responsáveis por suas colorações amarelas, alaranjadas e vermelhas (JOHNSON, 2002; AGARWAL, RAO, 2000).

Os carotenóides desempenham diversas funções e ações benéficas ao ser humano, as quais estão correlacionadas com a sua ação antioxidante, por isso não podem ser considerados apenas corantes naturais. Nos últimos anos, devido às suas propriedades antioxidantes, os carotenóides têm recebido considerável interesse dos pesquisadores, profissionais da área da saúde e agências regulatórias. Estudos também têm mostrado que os carotenóides podem mediar

seus efeitos via outros mecanismos tais como junção de comunicação gap, regulação do crescimento celular, modulação da expressão gênica, resposta imune e como moduladores da Fase I e II de enzimas metabolizadoras de drogas (PAIVA, RUSSELL, 1999; JEWELL, O´BRIEN, 1999; BERTRAM, 1999; ASTORG, 1997). A ação antioxidante dos carotenóides ocorre através da desativação de radicais livres e/ou de espécies reativas de oxigênio. Essa desativação pode ser por dois mecanismos: o primeiro, que consiste na associação direta com outra molécula formando compostos de degradação; e o segundo, através da desativação de espécies reativas, como o oxigênio singlete, $O_2(^1\Delta_g)$, pela transferência de energia sem prejuízos para a molécula de carotenóide que permanece com atividade antioxidante (RIOS, ANTUNES, BIANCHI, 2008).

Apesar do reconhecido papel benéfico dos carotenóides na saúde humana, eles não são considerados nutrientes essenciais e como tal, não têm um valor de ingestão de referência dietética (DRI) determinado. Baseado em estudos epidemiológicos, uma ligação positiva é sugerida entre ingestão de carotenóides e baixo risco de doenças crônicas (ELLIOTT, 2005; JOHNSON, 2002; AGARWAL, RAO, 2000). β-Caroteno e licopeno são inversamente relacionados ao risco de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (JOHNSON, 2002).

Vários trabalhos envolvendo diferentes estudos epidemiológicos e experimentos animais têm investigado seu potencial no processo carcinogênico. Um mecanismo racional para o potencial efeito anticarcinogênico e antimutagênico do β-caroteno e outros carotenóides é sua habilidade em seqüestrar os radicais livres que causam danos oxidativos ao DNA (ZHAO et al., 1998; SIES, STAHL, 1995). Em culturas celulares, os carotenóides inibem a proliferação celular, a transformação, a formação de micronúcleos e a expressão de certos genes (COLLINS et al., 2001).

1.3 Urucum e Bixina

Quando os conquistadores espanhóis chegaram ao Novo Mundo conheceram muitas plantas cujos extratos eram empregados pelos Maias e Astecas. Uma destas plantas, o urucum, existente ao longo da América tropical era usado pelos Índios sul-americanos na coloração de seus corpos, artesanatos, instrumentos de caça e pesca e como repelente de insetos. O nome científico do urucum, *Bixa orellana* foi dado por Francisco Orellana, após uma expedição na região da Amazônia Setentrional (GIULIANO, ROSATI, BRAMLEY, 2003).

O urucum é uma das maiores fontes naturais de corantes vermelhos (Figura 6). Entre os corantes naturais, o urucum se destaca como o segundo em importância econômica depois do caramelo (MERCADANTE, STECK, PFANDER, 1999).

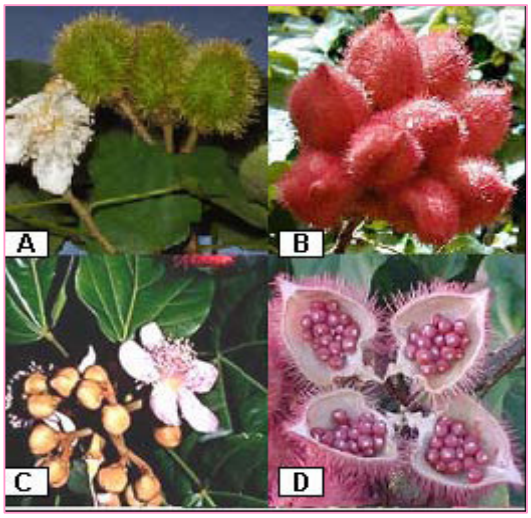
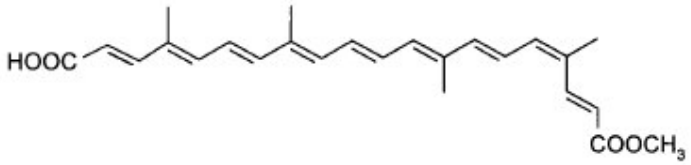


Figura 6. Fotos de urucum. A: fruto verde; B: fruto maduro; C: em floração; D: fruto aberto com sementes expostas. Fonte: http://www2.enq.ufsc.br/teses/d021.pdf

Os principais carotenóides presentes nas sementes de urucum, bixina e norbixina, formam um material colorido, conhecido como annatto, que é usado principalmente na indústria de alimentos. A coloração vermelha da semente está

diretamente relacionada ao percentual de bixina ($C_{25}H_{30}O_4$), aproximadamente 80%, e cuja estrutura se encontra na Figura 7 (PRESTON, RICKARD, 1980).



bixina

Figura 7. Estrutura da bixina.

A bixina, um carotenóide de cor vermelha, é a fração lipossolúvel do extrato do urucum e é empregada como corante natural em várias formulações na indústria alimentícia, tais como em manteigas, queijos, salsichas e sorvetes (DI MASCIO, DEVASAGAYAM, SIES, 1990).

A bixina foi citada pela primeira vez em 1825 por Boussingault e sua cristalização foi obtida com sucesso em 1878 por Etti (KARRER, JUCKER, 1950).

Os compostos de urucum sofrem grande interferência das condições de processo, tornando-se susceptíveis à decomposição provocada pelo calor, luz e oxidação, como também potencializada por determinados solventes (RIOS, BORSARELLI, MERCADANTE, 2005; MONTENEGRO et al., 2004). Uma vez isolada da semente, a bixina torna-se muito vulnerável à degradação. (SCOTTER, APLLETON, CASTLE, 2001).

É conhecido que diversos carotenóides protegem contra as transformações induzidas quimicamente em culturas de células (PUNG et al., 1993; WENIGER et al., 1993), e previnem ou modulam os danos genéticos causados por vários mutagênicos/carcinogênicos conhecidos (ALVES DE LIMA et al., 2003; COLLINS,

2001; MURE, ROSSMAN, 2001; MATOS, DI MASCIO, MEDEIROS, 2000; SALVADORI, RIBEIRO, NATARAJAN, 1994; SALVADORI et al., 1992). Segundo alguns estudos, os pigmentos do urucum não são considerados genotóxicos ou mutagênicos, baseados principalmente em dados *in vitro* (ISHIDATE et al., 1984; HAVELAND-SMITH, 1981). Fernandes et al. (2002) investigaram o potencial genotóxico dos pigmentos de urucum *in vivo* e observaram que a ingestão desses pigmentos não induziu quebras no DNA detectável em fígados e rins.

Dentre os carotenóides naturais, a bixina é um dos mais eficazes seqüestradores da molécula de oxigênio singlete e pode contribuir para a proteção das células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres (SANTOS et al., 2007; DI MASCIO, DEVASAGAYAM, SIES, 1990), sendo, portanto, um promissor agente quimioprotetor especialmente contra danos ao DNA induzidos por radicais livres de oxigênio ou compostos capazes de gerar tais moléculas.

A bixina é também um inibidor eficaz da peroxidação lipídica. Zhang, Cooney e Bertram (1991) estudaram o efeito de inibição da peroxidação, avaliando alguns carotenos, entre estes, o beta-caroteno, a luteína, o alfa-tocoferol, o licopeno e a bixina, avaliando a eficácia na inibição dos conseqüentes efeitos de transformações neoplásicas induzidas quimicamente. De todos os carotenóides testados, o alfa-tocoferol foi o mais ativo inibidor da peroxidação lipídica, seguido pela bixina.

1.4 Avaliação de danos ao DNA

A carcinogênese é um processo de múltiplos passos, envolvendo iniciação, promoção e progressão (SUGIMURA, 1992). Baseado neste conceito, a carcinogênese química tem sido alvo de uma grande variedade de tentativas para criar modelos preditivos alternativos, variando de ensaios biológicos de curto prazo

(ex. testes de mutagenicidade) para modelos teóricos (BENIGNI, ZITO, 2004). Com melhor entendimento dos possíveis caminhos para modular a carcinogênese, intervenções preventivas durante estes estágios tornam-se muito atraentes.

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. A mutação é conseqüência de danos no DNA e estes danos podem ser o processo inicial da formação do tumor por carcinógenos químicos (RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

Para se conhecer o potencial mutagênico e antimutagênico de um determinado composto, existem testes de mutagenicidade bem definidos e internacionalmente reconhecidos pelas agências reguladoras como parte da bateria de testes recomendada para o registro de novos produtos que entram no mercado mundial. A nova edição do "Guidelines for Carcinogen Risk Assessment", publicada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, aponta as alterações na expressão gênica, reparo do DNA, controle do ciclo celular, instabilidade genômica e danos cromossômicos como as principais conseqüências da exposição aos agentes ambientais e eventos críticos envolvidos no processo de carcinogênese (PRESTON, 2007). Esta preocupação com a identificação de fatores envolvidos na etiologia do câncer também inclui o papel da dieta e dos compostos bioativos dos alimentos, tais como os carotenóides.

Vários métodos citogenéticos têm sido utilizados para a monitorização biológica de populações expostas a agentes mutagênicos e carcinogênicos (ex. quantificação de micronúcleos).

O teste do micronúcleo (MN) tem sido amplamente empregado como indicador de exposição genotóxica, uma vez que sua ocorrência está associada às aberrações cromossômicas. Durante a telófase da mitose ou meiose podem ocorrer

quebras cromossômicas dando origem ao micronúcleo, que são fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Dessa forma, os micronúcleos são formados por uma discreta estrutura da cromatina, envolta por membrana nuclear, que deixam de se ligar aos fusos mitóticos e são excluídos do núcleo, não tendo qualquer ligação com o núcleo principal (KAYANE, PARRY, 2008; MALUF et al., 2001; DE OLIVEIRA, MACHADO-SANTELLI, 1987). É importante ressaltar que os danos no DNA somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular.

A ausência ou o defeito do fuso celular pode não levar a união dos cromossomos na placa metafásica, ocasionando a dispersão e divisão destes (DE OLIVEIRA, MACHADO-SANTELLI, 1987). Pode estar presente um ou mais por célula, com dimensão de até 1/3 do tamanho do núcleo (FENECH et al., 1999). Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na formação dos MN, incluindo as quebras cromossômicas e a ruptura dos fusos (MALUF et al., 2001; EVANS, 1988; HEDDLE et al., 1983).

Comparado à analise de cromossomos na metáfase, a quantificação de MN oferece muitas vantagens: é rápido e simples para desempenhar e não requer a preparação de células na metáfase (TUCKER, PRESTON, 1996). O teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese tem mais vantagens: permite a identificação confiável de células que completaram apenas uma divisão nuclear e a detecção de outros *endpoints*, tais como pontes dicêntricas (FENECH, 1997). Enfim, o teste do micronúcleo *in vitro* é uma ferramenta bastante importante no campo da Genética Toxicológica.

O Ensaio do Cometa é um teste simples, rápido e preciso que tem sido amplamente utilizado em estudo de epidemiologia molecular, no qual o dano ao DNA avaliado é usado como um biomarcador de exposição (COLLINS et al., 1997).

O Ensaio do Cometa oferece uma oportunidade para correlacionar níveis de danos ao DNA induzidos por terapia com a dose administrada e também para modular a dose reduzindo danos genotóxicos (SANCHES-SUÁREZ et al., 2008; MIYAMAE et al., 1998). Ele tem sido usado em uma ampla variedade de aplicações incluindo biomonitoramento humano, genotoxicologia, monitoramento ecológico e como uma ferramenta para investigar danos ao DNA e reparo em diferentes tipos celulares em resposta a uma série de agentes nocivos ao DNA (COLLINS, 2004). Em adição, este ensaio pode ser de grande valor ao beneficiar muitas áreas da investigação clínica, fornecendo informações valiosas sobre as características intrínsecas do DNA de células individuais e suas respostas a vários fatores externos, tais como radiação, químicos e drogas. Estas informações seriam relevantes no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer (MCKENNA, MCKEOWN, MCKELVEY-MARTIN, 2008).

Para avaliar danos ao DNA em células individuais, Ostling e Johanson (1984) desenvolveram um método baseado na eletroforese de células imersas e lisadas em agarose em lâminas de microscopia. O mecanismo subjacente é que quando ocorrem quebras nas fitas do DNA, que é organizado como uma grande estrutura supercoloidal, esta estrutura torna-se relaxada e pode, assim, ser carregada na eletroforese. Singh et al. (1988) modificaram esta técnica para permitir uma avaliação de danos ao DNA em células únicas sob condições alcalinas. Esta abordagem otimiza a desnaturação do DNA e permite uma avaliação de quebras de fita-simples e locais álcali-lábeis (TICE et al., 2000).

A versão alcalina da análise de eletroforese em gel de célula única (Ensaio Cometa) é capaz de detectar quebra em fita simples do DNA, locais álcali-lábeis, ligações cruzadas entre DNA-DNA/DNA-proteína, e quebra de fita simples associado com locais de reparo incompleto (TICE et al., 2000). Comparado com outros testes de genotoxicidade, as vantagens do Ensaio do Cometa incluem sua sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA, a necessidade de pequeno número de células por amostra, sua flexibilidade, seu baixo custo, sua facilidade de aplicação e o pouco tempo necessário para completar o experimento. É uma técnica bem adequada para a monitorização de trabalhadores expostos a riscos genotóxicos (NESSLANY et al., 2007; KASSIE, PARZEFALL, KNASMÜLLER, 2000; TICE et al., 2000; KRUSZEWSKI et al., 1998; WOJEWODZKA et al., 1998; MCKELVEY-MARTIN et al., 1993).

Resumidamente, o Ensaio do Cometa é um procedimento simples, rápido e sensível para medir quebras no DNA em um pequeno número de células. As células são incorporadas em uma fina camada de agarose em uma lâmina de vidro, e lisadas em uma solução contendo detergente e 2,5 M NaCl. Desta forma, as membranas e os constituintes celulares solúveis, bem como as histonas, são removidos, deixando o DNA ainda supercoloidal e ligado a matriz helicoidal. Posterior incubação alcalina e eletroforese fazem com que o DNA contendo quebras se mova para o anodo, formando uma “cauda de cometa” quando visualizado por microscopia de fluorescência com um corante adequado. As imagens lembram cometas e o conteúdo relativo de DNA na cauda indica a freqüência de quebras. As “quebras” no contexto do Ensaio do Cometa alcalino incluem locais apurínicos/apirimidínicos (AP), os quais são álcali-lábeis (DUSINSKA, COLLINS, 2008).

Vários artigos sugerem que a migração do DNA na eletroforese é diminuída por ligações intercadeias, mas facilitada por ligações intracadeias (PANG et al., 2007; WOZNIAK, CZECHOWSKA, BLASIAK, 2004; TICE et al., 2000; FAIRBAIRN, OLIVE, O´NEILL, 1995;). A migração do DNA facilitada por ligações intracadeias é provavelmente devido a quebras na fita simples, resultado de bases alquiladas que estão sendo submetidas ao reparo do DNA, e que estas bases são álcali-lábeis (MIYAMAE et al., 1997).

Naturalmente, nem todas as drogas produzem danos que podem ser medidos por meio do Ensaio do Cometa, mas ele ainda tem se revelado um instrumento útil na avaliação da sensibilidade de células cancerosas em relação a vários compostos (MCKENNA, MCKEOWN, MCKELVEY-MARTIN, 2008). A sensibilidade das células a agentes químicos mutagênicos, bem como a sua capacidade para reparar os subseqüentes danos, podem ser medidos utilizando o ensaio cometa. Várias drogas, que são rotineiramente utilizadas na quimioterapia, foram investigadas em uma série de linhagens celulares tumorais humanas *in vitro,* incluindo a cisplatina (FRIEDMANN et al., 2004; YAMAUCHI, KAWAI, UEDA, 2003), a mitomicina C (MCKENNA et al., 2003; SUGGITT et al., 2003), o tamoxifeno (WOZNIAK et al., 2007; LIU et al., 2003) e epirubicina (ZOLI et al., 2004). O sucesso desta abordagem significa que os investigadores podem explorar se as células tumorais podem ser mais sensibilizadas com a ação de drogas quimioterápicas por meio da introdução de outros fatores. Por exemplo, as células podem ser tratadas *in vitro* com combinações de drogas, com componentes que interferem com as vias de reparo do DNA ou com uma combinação de drogas e agentes nocivos. Dessa forma, a análise do Ensaio do Cometa pode avaliar se ocorre aumento de danos ao DNA e/ou morte celular (MCKENNA, MCKEOWN, MCKELVEY-MARTIN, 2008).

A genotoxicidade da cisplatina e seus efeitos colaterais, como a neurotoxicidade, já estão bem documentados na literatura. Assim, estudos mostram que a cisplatina, além de formar ligações cruzadas com o DNA, inibe certas enzimas, entre elas a glutationa, alterando o estado redox da célula. Este fato pode resultar na diminuição da capacidade antioxidante e conseqüente aumento de espécies reativas de oxigênio intracelular (SHEIKH-HAMAD, 2008). Portanto, é grande o interesse na associação de um agente antioxidante capaz de diminuir seus efeitos tóxicos em células saudáveis. Dessa forma, este estudo busca avaliar a capacidade protetora do urucum e da bixina contra os danos genotóxicos induzidos pela cisplatina em células PC12.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o possível efeito protetor do urucum e do carotenóide bixina sobre a citotoxicidade e a genotoxicidade induzidas pelo antitumoral cisplatina em células PC12.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar concentrações de cisplatina indutoras de danos às células PC12 que não sejam citotóxicas;
- Identificar concentrações de urucum e de bixina que não sejam citotóxicas às células PC12, isto é, apresentem no mínimo 80% de viabilidade celular;
- Avaliar a genotoxicidade do urucum e da bixina às células PC12, identificando concentrações não genotóxicas;
- Determinar a freqüência de danos cromossômicos (pelo Teste do Micronúcleo) e a extensão de danos ao DNA (detectada pelo Ensaio Cometa) presentes em células PC12 das amostras de urucum ou bixina associadas com cisplatina.
- Avaliar comparativamente a genotoxicidade e a antigenotoxicidade do urucum e da bixina.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

A cisplatina (cis-diamminedichloroplatinum II, cDDP; CAS Nº. 15663-27-1) foi obtida na sua formulação comercial da Quiral Química do Brasil S.A. (Platinil®). A bixina, um produto insolúvel em água, foi extraída e cristalizada a partir de sementes de urucum adquiridas no comércio de Ribeirão Preto, São Paulo, de acordo com a metodologia descrita por Rios e Mercadante (2004). O urucum em pó foi doado pela Corantec Corantes Naturais Ltda contendo aproximadamente 7% de bixina (Anexo 1 e 2). O meio de cultura RPMI 1640, a citocalasina B (CAS Nº. 14930-96-2) e o dimetilsulfóxido (DMSO) (CAS Nº. 67-68-5) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Soro bovino fetal e soro equino inativados pelo calor, agarose de baixo ponto de fusão, agarose de ponto de fusão normal e mix de antibióticos foram provenientes da Invitrogen Brasil Ltda. Os demais reagentes foram de grau analítico.

3.1.1 Obtenção e cristalização da bixina

As sementes de urucum foram lavadas com hexano e metanol (Figura 8). Após a lavagem, foi adicionado acetato de etila e o líquido transferido para um balão. O extrato obtido foi seco em um evaporador rotatório (T<30ºC), e o extrato seco diluído em diclorometano e aquecido em placa de aquecimento (T<50ºC). Lentamente foi adicionado etanol absoluto gelado. A mistura foi levada para um banho de gelo e depois colocada no freezer por 24 horas. Os cristais de bixina formados foram filtrados e lavados com etanol absoluto gelado e secos em estufa a vácuo por 24 horas. O grau de pureza obtido foi de 93-95% segundo Rios e Mercadante (2004). As soluções de bixina foram preparadas com 0,4% de DMSO e

água destilada autoclavada. O DMSO foi utilizado para auxiliar na solubilidade da bixina, que é insolúvel em água.

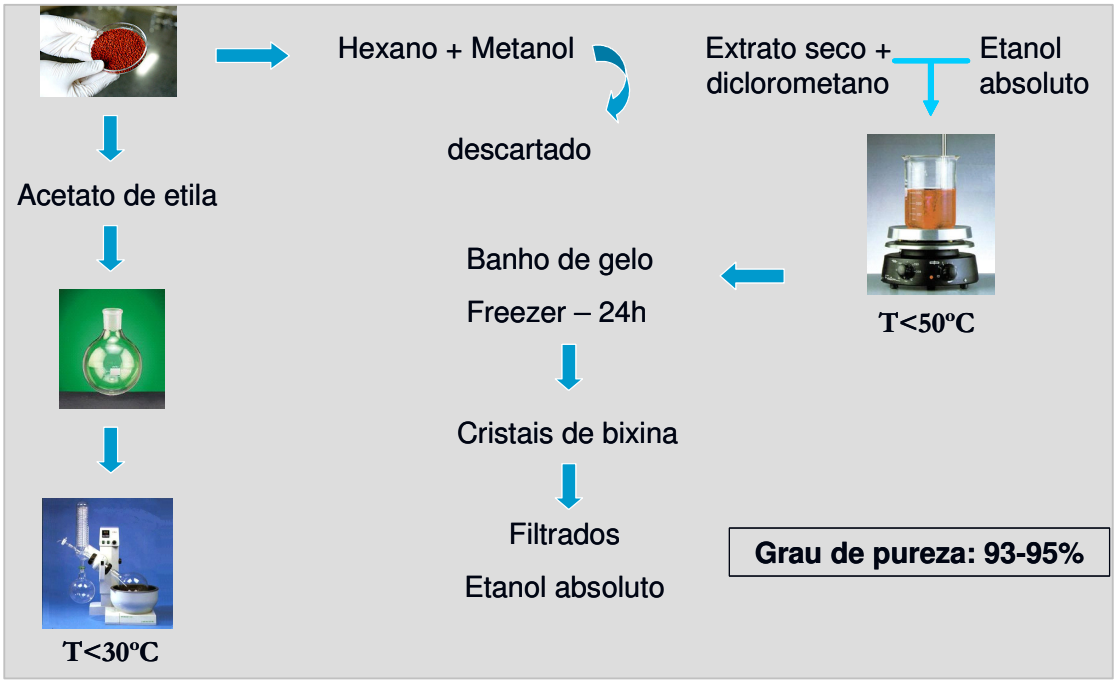


Figura 8. Esquema simplificado da extração e cristalização da bixina.

3.1.2 Linhagem celular e condições de cultura

Células PC12, isoladas de feocromocitoma de ratos, obtidas da ATCC (American Type Culture Collection) foram cedidas pelo laboratório de Toxicologia da FCFRP/USP. As células foram cultivadas em frascos de 25 cm^2 e 75 cm^2 em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro equino inativado pelo calor, 5% de soro bovino fetal inativado pelo calor e antibióticos penicilina/estreptomicina (60 U/mL) e mantidas a 37 ºC em incubadora HEPA CLASS 100 da Thermo Electron Corporation contendo 95% de ar e 5% de CO_2 (GREENE e TISCHLER, 1976). Para a determinação da viabilidade celular foi utilizado o meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol. Os experimentos foram realizados com as células entre a 3º e a 5º passagem

após o descongelamento. Em todos os métodos foi realizado pré-tratamento com urucum ou com bixina 1 hora antes do tratamento com a cisplatina.

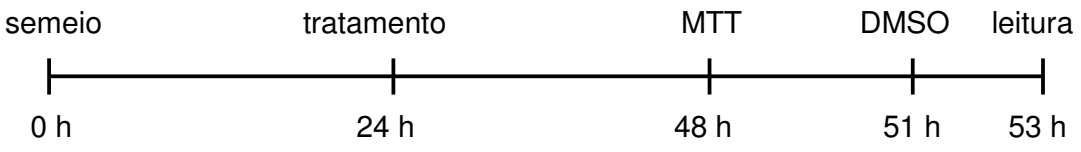
3.2 Métodos

3.2.1 Protocolo experimental

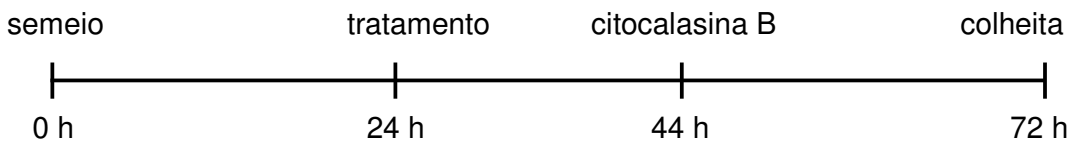
O delineamento experimental foi realizado por meio da avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade da cisplatina, da citotoxicidade do urucum e da bixina em células PC12 pelo método de viabilidade celular (MTT) e Teste do Micronúcleo, para determinar as concentrações desses agentes a serem testadas nos grupos experimentais. A concentração de cisplatina selecionada deveria induzir genotoxicidade com baixo grau de citotoxicidade, e as concentrações de urucum e bixina selecionadas não deveriam apresentar citotoxicidade.

No método MTT para cada agente as seguintes concentrações foram testadas de acordo com o protocolo a seguir:

- cisplatina: 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0 e 150,0 μg/mL.
- urucum: 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 μg/mL.
- bixina: 0,05, 0,08, 0,10, 0,30, 0,50, 0,80, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 μg/mL.



No Teste do Micronúcleo a cisplatina foi testada nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 µg/mL de acordo com o protocolo a seguir:



3.2.2 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium), segundo procedimento descrito por Malecki (2001), com pequenas modificações. As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços em uma densidade de 1 x 10^5 células por mL de meio, e incubadas por 24 horas antes do tratamento nas condições anteriormente descritas. Três horas antes do fim do período de incubação, foram adicionados 10 µL de uma solução 5 mg/mL de MTT e as células voltaram às condições normais de incubação. Ao término do período de incubação foi adicionado 100µL de DMSO e a placa foi protegida da luz por 2 horas ou até que todos os cristais formados fossem solubilizados. A absorbância da solução final foi determinada a 570 nm usando um leitor de microplacas Sigma. A viabilidade das culturas tratadas foi determinada estabelecendo-se uma relação entre a absorbância obtida no grupo tratado e a obtida no grupo controle. A solução de lise foi usada como branco de reagentes. Cada experimento foi realizado em triplicata e os valores obtidos corresponderam à média de três experimentos independentes. Para as análises de genotoxicidade foram utilizadas as concentrações com mais de 80% de viabilidade celular.

3.2.3 Teste do Micronúcleo

Para a obtenção dos micronúcleos (MN) em células PC12 binucleadas (BN) foi adaptado o protocolo descrito por Fenech et al. (1999) e Fenech (2002).

Foram semeadas 1 x 10^6 células em placas de cultura de células 100mm x 20mm e adicionado meio RPMI 1640 completo para um volume final de 5 mL. Após o período de incubação de 24 horas, as células foram tratadas com cisplatina, urucum ou bixina, de acordo com os grupos experimentais descritos no item 3.3. Também foi realizado o pré-tratamento com urucum ou bixina 1 hora antes do tratamento com cisplatina. Após 44 horas do início das culturas, foi adicionado citocalasina B, na concentração final de 6,0 µg/ml de meio de cultura.

Após um total de 72 horas a 37 ºC, as células foram coletadas por centrifugação a 212 g por 9 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e as células foram ressuspendidas delicadamente em 5 mL de solução hipotônica ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, 0,034M) a 4°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 0,5 mL de fixador recém preparado (metanol - ácido acético na proporção 3:1), e o material homogeneizado e centrifugado a 212 g por 9 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspendidas em 5 mL de fixador e 25 µL de formaldeído, centrifugando em seguida o material a 212 g por 9 minutos. O sobrenadante foi novamente desprezado, as células ressuspendidas em 5 mL de fixador, e o material centrifugado pela ultima vez. O sobrenadante foi desprezado, deixando 0,5 mL de material para confecção das lâminas.

As lâminas bem limpas, molhadas e geladas foram preparadas espalhando-se uniformemente o material, com auxílio de pipeta Pasteur, mantendo-as levemente inclinadas. As lâminas foram secas à temperatura ambiente para posterior coloração.

As preparações foram coradas com uma solução de Giemsa diluído em tampão fosfato (NA_2HPO_4 e KH_2PO_4 a 0,06M e pH 6,8) na proporção 1:30 por 10 minutos.

As lâminas codificadas foram analisadas em teste cego, em microscópio de luz Zeiss (Germany) em aumento de 400x ou 1000x, quando necessário. Para cada tratamento, as seguintes informações foram obtidas:

1- Número de MN em 1000 células BN, num total de 2000 células por tratamento.

2- Distribuição de células BN com zero, um ou mais MN;

3- IPBC: índice de proliferação de células sujeitas ao bloqueio da citocinese. O IPBC é um índice de citotoxicidade, que indica o número médio de ciclos celulares que uma dada célula foi submetida, o qual é biologicamente relevante no caso de células com a citocinese bloqueada. Esse índice é calculado de acordo com a seguinte expressão: IPBC = [M1 + 2(M2) + 3(M3 + M4)]/N, onde M1-M4 representam os números de células com um a quatro núcleos, respectivamente, sendo considerado que M3 e M4 estão igualmente no seu terceiro ciclo celular, e N é o número total de células contadas, como proposto por Surrallés et al. (1995).

As células contadas para a freqüência de MN seguiram as características de células BN, com os dois núcleos possuindo membranas nucleares intactas e situados dentro do mesmo limite citoplasmático, iguais em tamanho, padrão de coloração e intensidade de coloração, podendo se tocar, mas idealmente não sobrepor-se um ao outro. Células com os dois núcleos sobrepostos somente foram contadas se os limites nucleares fossem distinguíveis (Figura 9 A e B).

Os MN contados seguiram as características de terem entre 1/16 e 1/3 do diâmetro médio dos núcleos principais, não serem refratários podendo, portanto, serem facilmente distinguidos de artefatos, como partículas de coloração. Não estarem ligados ou conectados aos núcleos principais e o limite micronuclear ser

distinguível do limite nuclear, com a mesma intensidade de coloração que os núcleos principais, podendo ocasionalmente a coloração ser mais intensa (Figura 9 C e D).

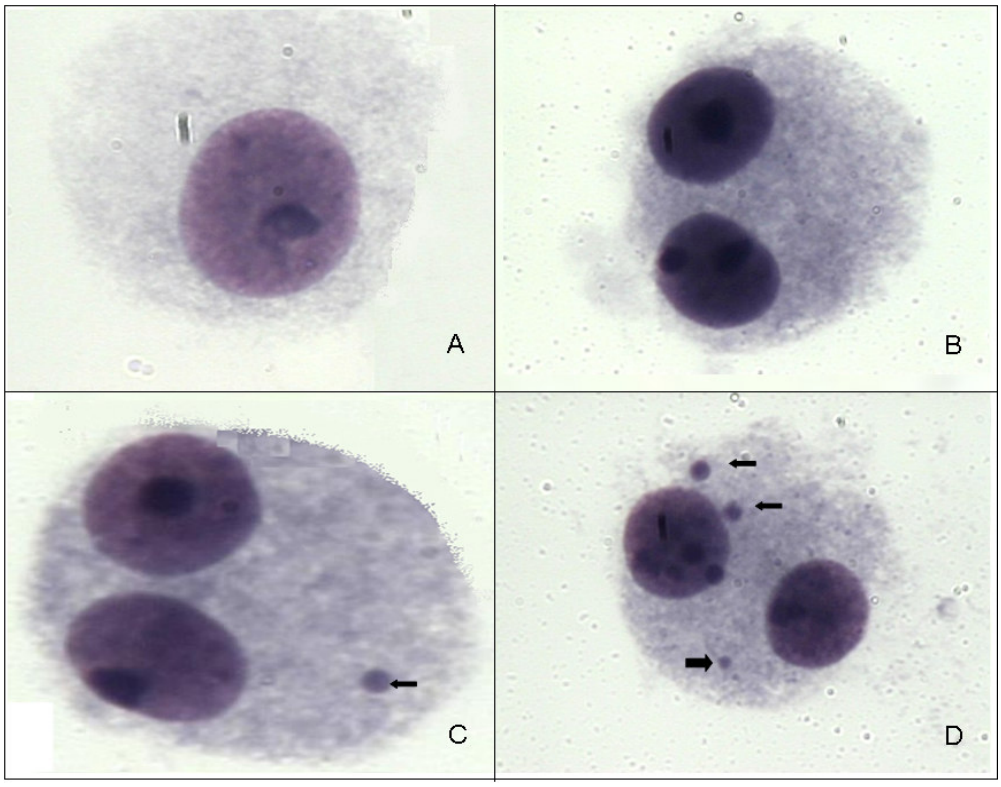


Figura 9. Microfotografia de células PC12 obtidas na análise de MN. (A) célula PC12 mononucleada, (B) célula PC12 binucleada, (C) célula PC12 binucleada com um micronúcleo e (D) célula PC12 binucleada com três micronúcleos. Aumento original 1000x, coloração Giemsa.

3.2.4 Análise de eletroforese em gel de célula única (Ensaio do Cometa)

O procedimento geral para o teste de genotoxicidade (Ensaio do Cometa), originalmente descrito por Singh et al. (1988), seguiu o protocolo proposto por Tice et al. (2000). Foram semeadas 1 x 10^6 células em frascos de cultura de 25 cm^2. Após o período de incubação de 24 horas, as células foram tratadas por 4 horas com cisplatina, bixina ou urucum e suas associações, de acordo com os grupos experimentais descritos no item 3.3.

A viabilidade celular das culturas foi avaliada pela técnica de exclusão por azul de tripan. Com este método de determinação de citotoxicidade, as células foram analisadas individualmente e somente foram submetidas ao teste do cometa as culturas que apresentaram mais de 70% de viabilidade celular.

Em um microtubo foram misturados e homogeneizados 10 µL de suspensão celular e 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), e adicionados 100 µL dessa mistura homogênea sobre uma lâmina previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). O material foi coberto com uma lamínula (24 x 60mm) e deixado a 4ºC por 5 minutos. Após esse período, a lamínula foi retirada delicadamente e as lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise recém preparada a 4ºC (NaCl 2,5 M, EDTA100 mM, Tris 10mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) por pelo menos duas horas. Após a lise, as lâminas foram imersas em uma solução alcalina (NaOH 300 mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos a 4°C, e posteriormente foram transferidas para uma cuba de eletroforese horizontal contendo o mesmo tampão, também a 4ºC, onde aplicou-se por 20 minutos uma corrente elétrica de 25V e 300mA.

Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas em solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos, secas à temperatura ambiente e fixadas em etanol absoluto por 3 minutos. Todas as lâminas foram confeccionadas em duplicata e armazenadas em geladeira até o momento da análise.

A análise de todas as lâminas do ensaio Cometa foi feita após coloração com brometo de etídio (20 µL/mL), em microscópio de epi-fluorescência Zeiss (Germany), usando um filtro de excitação de 515 – 560 nm e um filtro de emissão de 590 nm e objetiva de 40X. Foram capturadas aleatoriamente 100 imagens de nucleóides (Figura 10) usando uma câmera Axiocan (Zeiss) pelo programa AxioVision 3.1

(Zeiss). Esta etapa foi realizada no laboratório de Citogenética e Mutagênese da FMRP-USP de responsabilidade das Professoras Doutoras Catarina Satie Takahashi e Elza Sakamoto Hojo. As imagens foram analisadas pelo programa Comet Score®, da Tritek, cujo acesso é gratuito, no Laboratório de Bromatologia e Nutrição da FCFRP-USP. Os parâmetros considerados pela leitura do programa foram a porcentagem de DNA na cauda do cometa (%DNA), o *Tail Moment* (TM) e o *Olive Tail Moment* (OTM).

Foram realizados 3 experimentos independentes e em cada um foram utilizadas lâminas codificadas para cada grupo de tratamento. Foram analisadas duas lâminas por grupo de tratamento em cada experimento. Em cada lâmina foram analisados 50 nucleóides.

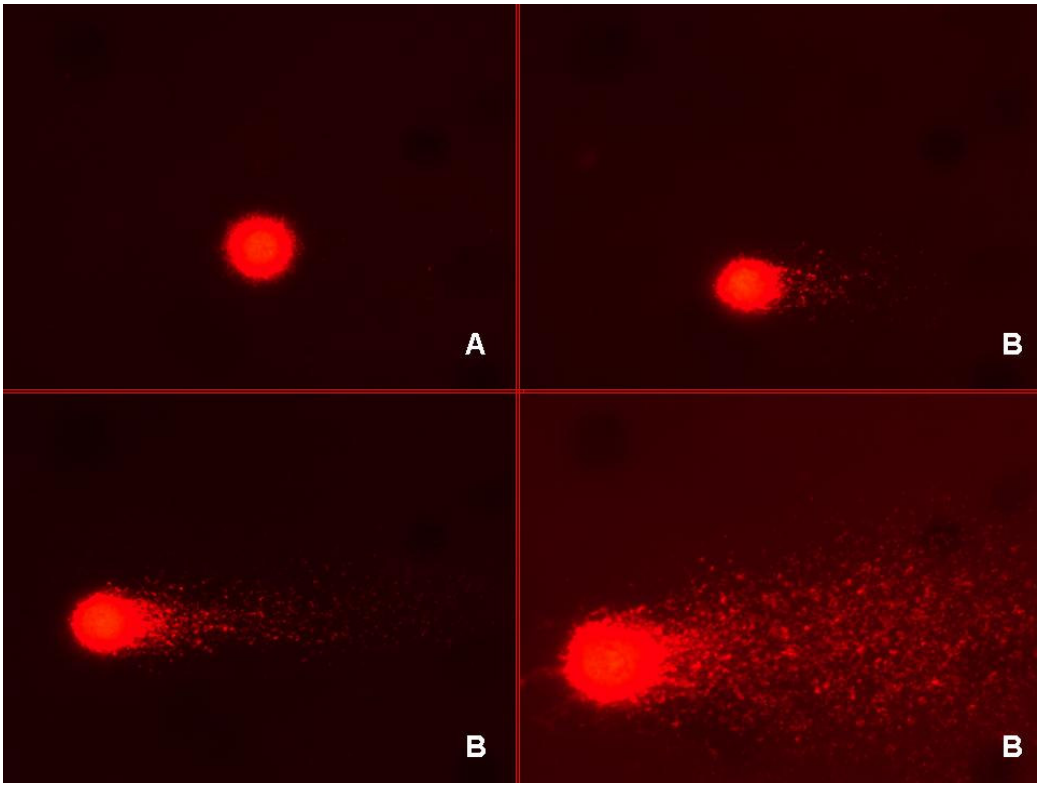


Figura 10. Microfotografia de um nucleóide íntegro (A) e em forma de cometa com diferentes intensidades de danos (B) obtido pelo Ensaio Cometa em células PC12. Aumento original 40X. Coloração com brometo de etídio.

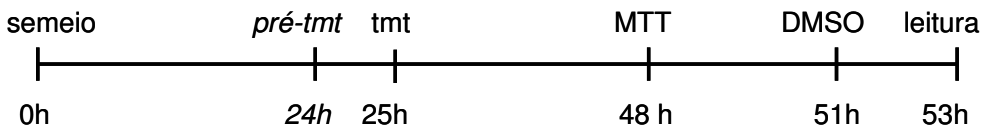
3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para o tratamento dos grupos experimentais foi selecionada uma concentração de cisplatina como indutora de danos, três concentrações de urucum e três concentrações de bixina que foram avaliadas como agentes protetores pelo Teste do Micronúcleo e Ensaio do Cometa. Os protocolos de tratamento foram realizados de acordo com os grupos descritos a seguir:

- Grupo controle negativo (C): as células foram incubadas sem qualquer tratamento.
- Grupo controle solvente (CS): as células foram incubadas com 0,4% de dimetilsulfóxido (DMSO).
- Grupo Urucum (URC): as células foram incubadas com três concentrações de urucum (0,2, 0,5 e 1,0 μg/mL).
- Grupo Bixina (BXN): as células foram incubadas com três concentrações de bixina (0,05, 0,08 e 0,10 μg/mL).
- Grupo Cisplatina (cDDP): as células foram incubadas com 0,1 μg/mL de cisplatina.
- Grupo Solvente + Cisplatina (CS + cDDP): tratamento com 0,1 μg/mL de cisplatina e pré-tratamento com dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,4%.
- Grupo Urucum + Cisplatina (URC + cDDP): pré-tratamento com urucum (0,2, 0,5 e 1,0 μg/mL) e tratamento com 0,1 μg/mL de cisplatina.
- Grupo Bixina + Cisplatina (BXN + cDDP): pré-tratamento com bixina (0,05, 0,08 e 0,10 μg/mL) + tratamento com 0,1 μg/mL de cisplatina.

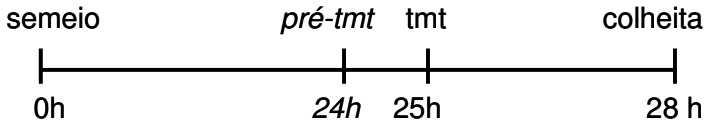
Os grupos experimentais foram tratados em cada método de acordo com os protocolos a seguir:

Método do MTT:



Teste do Micronúcleo:

Ensaio do Cometa:



3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos tratamentos com a cisplatina, o urucum e a bixina foram analisados comparando-os com as culturas controle negativo. Já os resultados do pré-tratamento com urucum ou com bixina 1 hora antes do tratamento com a cisplatina foram analisados comparando-os com as culturas tratadas apenas com a cisplatina e com o controle negativo. Os resultados apresentados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com $p<0,05$, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Cisplatina

4.1.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular após exposição à cisplatina em células PC12 foi verificada pelo método do MTT a fim de estabelecer uma concentração experimental com baixa citotoxicidade a ser utilizada nos experimentos subseqüentes.

As culturas de células PC12 receberam tratamento de cisplatina nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0 e 150,0 μg/mL. Além dos tratamentos, o experimento incluiu um grupo controle negativo (culturas não tratadas), e este foi considerado com 100% de viabilidade celular. A viabilidade das culturas tratadas com cisplatina foi determinada estabelecendo uma relação entre a absorbância obtida no grupo tratado e a obtida no grupo controle negativo.

A Figura 11 mostra a viabilidade dose-dependente das células PC12 tratadas com cisplatina.

Verificou-se que as concentrações até 10 μg/mL de cisplatina foram pouco citotóxicas às células PC12, com redução de até 18% da viabilidade celular. Já os tratamentos com cisplatina acima de 15 μg/mL apresentaram uma citotoxicidade mais expressiva, com redução acima de 20%, sendo significativamente diferentes quando comparadas ao grupo controle negativo ($p<0,05$). A concentração de 150 μg/mL apresentou redução de 97% na viabilidade celular.

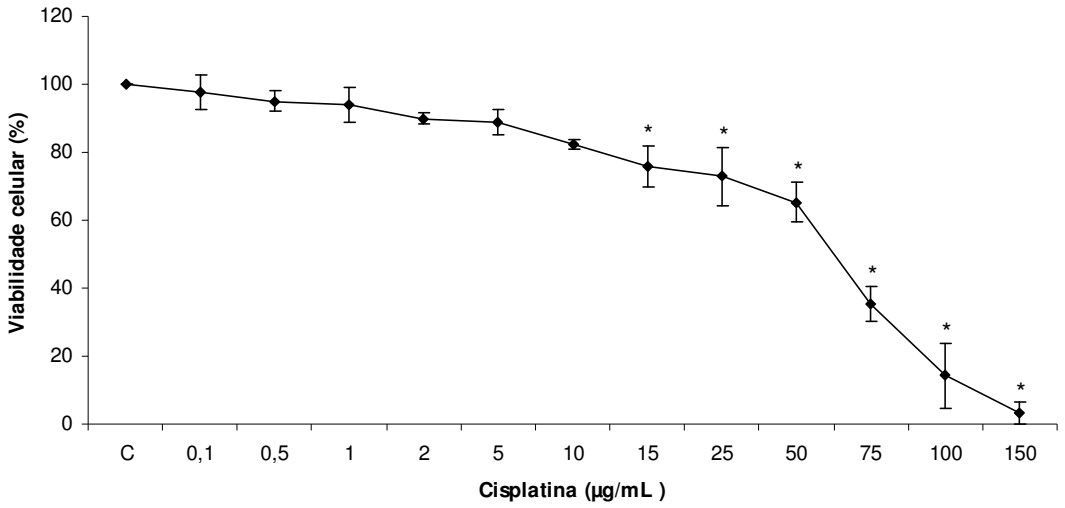


Figura 11. Avaliação do efeito citotóxico da cisplatina em células PC12. C: controle: culturas não tratadas e consideradas com 100% de viabilidade. *estatisticamente diferente do controle ($p<0,05$).

4.1.2 Micronúcleo

Inicialmente foi verificada qual concentração de cisplatina era genotóxica, porém não citotóxica a fim de se obter uma concentração ideal para realizar os experimentos seguintes. Para isso, foi utilizado o Teste do Micronúcleo com avaliação da porcentagem de células binucleadas (BN), do índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) e da freqüência de micronúcleos (MN) em células PC12.

A Tabela 1 apresenta os dados de distribuição de células de acordo com o número de núcleos e a porcentagem de células binucleadas (%BN). Foi possível observar que entre as concentrações testadas apenas no tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina foi obtido número suficiente de células BN para a análise da freqüência de MN, que deve ser acima de 35% (Fenech, 2000).

Tabela 1. Distribuição de células de acordo com o número de núcleos em cultura de células PC12 tratadas com diferentes concentrações de cisplatina submetidas ao Teste do Micronúcleo (MN)

Tratamentos	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos				%BN
	1	2	3	4	
Controle negativo	165	831	3	1	83,1
0,1 µg/mL	516	480	3	1	48,0
0,5 µg/mL	924	75	1	0	7,5
1,0 µg/mL	960	38	2	0	3,8
1,5 µg/mL	977	23	0	0	2,3
2,0 µg/mL	992	8	0	0	0,8

Em cada experimento (n=3) foram analisadas 1000 células por tratamento. %BN: porcentagem de células binucleadas.

Os resultados da análise do índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) estão apresentados na Figura 12.

Foi possível observar que todos os tratamentos com cisplatina reduziram significativamente os valores do IPBC em comparação ao controle negativo ($p<0,05$). A redução do IPBC na concentração de 0,1 µg/mL de cisplatina foi de 19%, enquanto que nas concentrações de cisplatina acima de 0,5 µg/mL a redução do IPBC foi entre 41% e 45%.

Na Figura 13 estão apresentados os valores médios do número de micronúcleos encontrados em 1000 células PC12 binucleadas nas culturas controle e tratada com 0,1 µg/mL de cisplatina.

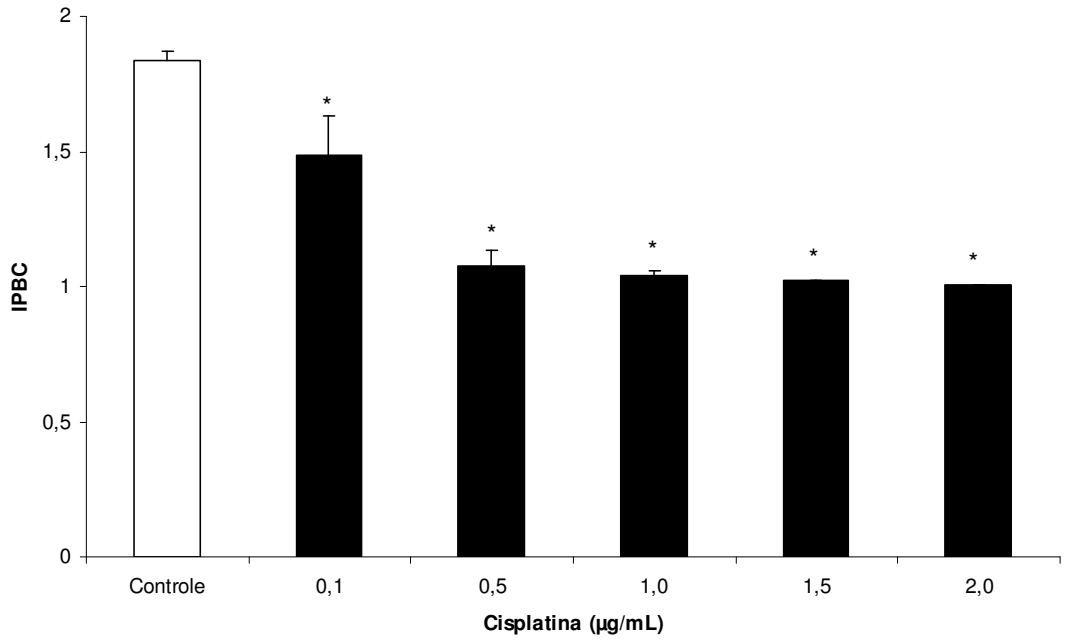


Figura 12. Índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células PC12 tratadas com cisplatina. Em cada experimento (n=3) foram analisadas 1000 células por tratamento. *estatisticamente diferente do controle ($p<0,05$).

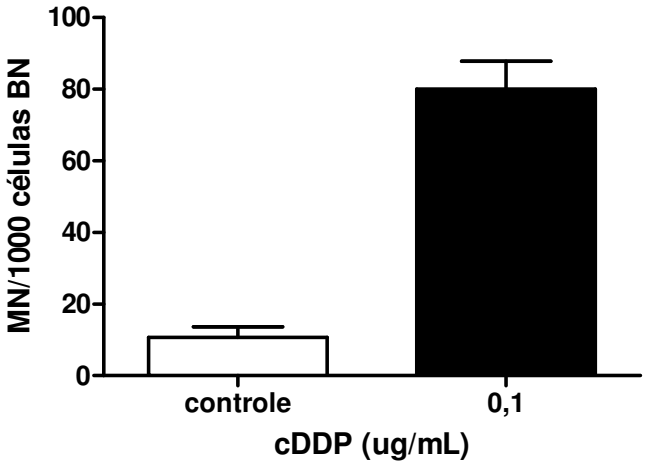


Figura 13. Indução de micronúcleos pela cisplatina em células PC12. Os resultados expressam a média ± desvio-padrão de três experimentos independentes. Em cada experimento (n=3) foram analisadas 2000 células binucleadas por tratamento.

Como mencionado anteriormente, apenas nas culturas tratadas com 0,1 μg/mL de cisplatina foi possível realizar a análise dos micronúcleos. Este tratamento resultou em freqüência média de 80 MN por 1000 células BN, diferindo significativamente ($p<0,05$) do controle negativo, que apresentou freqüência média de 11 MN por 1000 células BN. Dessa forma, a concentração de 0,1 μg/mL de cisplatina foi definida como a concentração a ser usada como indutora de danos às culturas PC12.

4.2 Urucum

4.2.1 Avaliação citotóxica e genotóxica

O possível efeito citotóxico do urucum também foi avaliado pelo método do MTT em culturas de células PC12. As células foram tratadas com urucum por 24 horas nas concentrações de 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 µg/mL. Este ensaio incluiu o controle solvente, que é o tratamento com dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,4%, usado como solvente para o urucum.

A Figura 14 mostra que a resposta de viabilidade celular ao tratamento ocorreu de maneira dose dependente em células PC12. A redução da viabilidade celular das culturas tratadas com urucum até 2,0 µg/mL foi de 13%, não diferindo significativamente ($p>0,05$) do grupo controle negativo. Já as culturas tratadas acima de 3,0 µg/mL foram significativamente diferentes ($p<0,05$) com redução de até 27% na viabilidade celular.

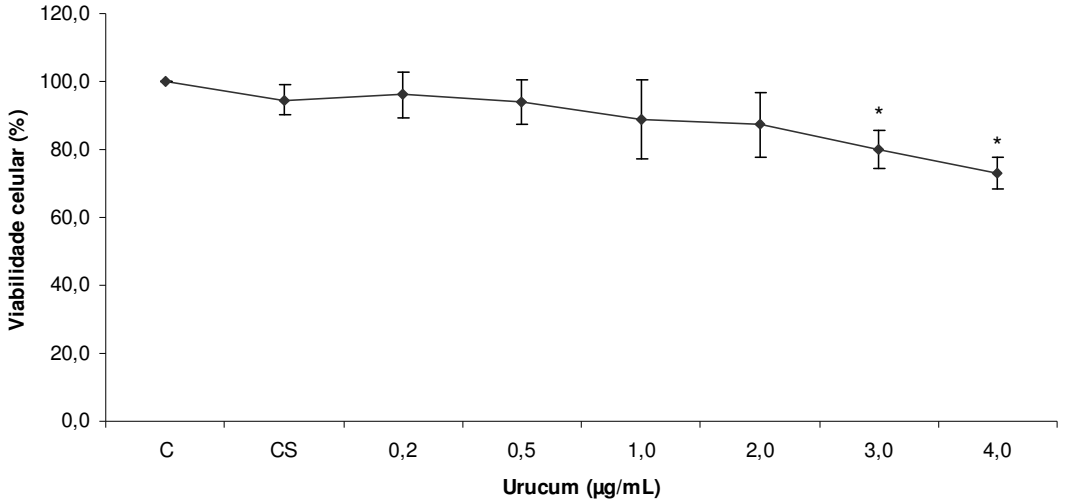


Figura 14. Avaliação do efeito citotóxico do urucum em células PC12. C (controle): culturas não tratadas e consideradas com 100% de viabilidade. CS (controle solvente): culturas tratadas com 0,4% de DMSO. *estatisticamente diferente do controle ($p<0,05$).

A genotoxicidade do urucum em células PC12 foi determinada pelo Teste do Micronúcleo e pela avaliação da extensão dos danos ao DNA pelo Ensaio do Cometa.

As concentrações de urucum avaliadas no Teste do Micronúcleo foram 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 µg/mL, avaliadas pela porcentagem de células binucleadas (BN), pelo índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) e pela frequência de micronúcleos (MN) em células PC12 BN. O experimento incluiu um grupo controle negativo que se refere às culturas não tratadas, e um grupo solvente, que é o tratamento com DMSO a 0,4%.

Na Tabela 2 estão apresentados os dados de distribuição de células de acordo com o número de núcleos e a porcentagem de células binucleadas (%BN). Foi possível observar que todos os tratamentos apresentaram porcentagem de células BN suficientes para análise, isto é, acima de 35% (Fenech, 2000).

Tabela 2. Distribuição de células de acordo com o número de núcleos em cultura de células PC12 tratadas com diferentes concentrações de urucum submetidas ao Teste do Micronúcleo (MN)

Tratamentos	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos				% BN
	1	2	3	4	
Controle	133	364	2	1	72,8
Controle solvente	142	355	3	0	71,0
Urucum					
0,2 µg/mL	139	358	2	1	71,6
0,5 µg/mL	154	344	1	1	68,8
1,0 µg/mL	147	350	3	0	70,0
2,0 µg/mL	159	339	2	0	67,8
3,0 µg/mL	194	304	1	1	60,8
4,0 µg/mL	183	316	1	0	63,2

Em cada experimento (n=3) foram analisadas 500 células por tratamento. %BN: porcentagem de células binucleadas. Controle: culturas não tratadas e consideradas com 100% de viabilidade. Controle solvente: culturas tratadas com 0,4% de DMSO.

Os resultados da análise do índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) estão apresentados na Figura 15. Apenas as concentrações acima de 2,0 µg/mL foram significativamente diferentes (p<0,05) do controle negativo, com redução do IPBC de até 26%.

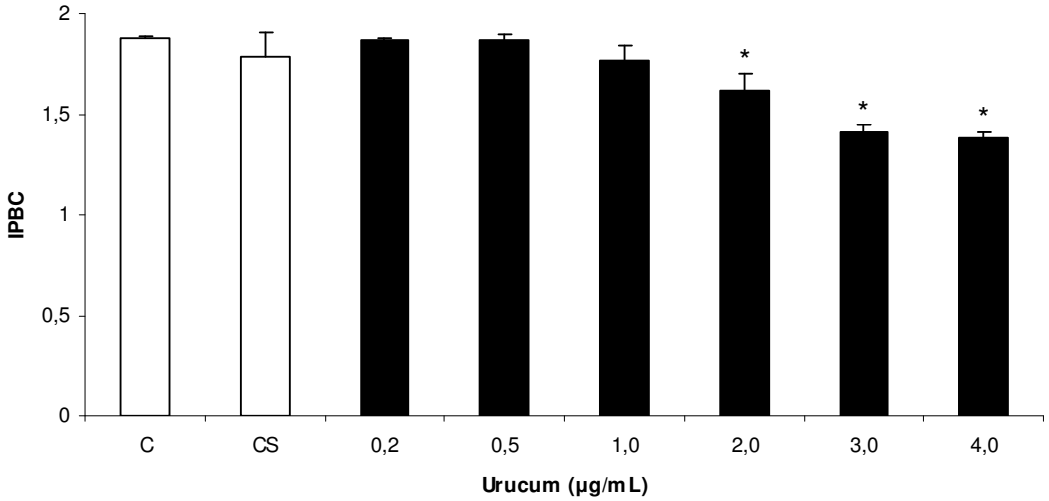


Figura 15. Índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células PC12 tratadas com urucum com concentrações de 0,2 a 4,0 µg/mL. Em cada experimento (n=3) foram analisadas 500 células por tratamento. C: controle negativo. CS: controle do solvente (0,4% de DMSO). *estatisticamente diferente do controle (p<0,05).

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios do número de micronúcleos encontrados por 1000 células PC12 binucleadas tratadas com urucum.

Os tratamentos com 0,2, 0,5 e 1,0 µg/mL de urucum resultaram em freqüência média de 6,7, 9,0 e 17,7 MN por 1000 células BN, respectivamente, semelhantes (p>0,05) ao grupo controle negativo. Entretanto, os tratamentos acima de 2,0 µg/mL de urucum resultaram em maior frequência de MN quando comparado ao resultado do grupo controle negativo, sendo estatisticamente diferente (p<0,05).

Tabela 3. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células binucleadas (BN) em células PC12 sem tratamento (controle) e tratadas com urucum em diferentes concentrações

Grupo	**Conteúdo de Bixina no Urucum (µg/mL)**	**MN/1000 BN média ± DP**
Controle	—	10,0 ± 3,6
Controle solvente	—	11,3 ± 2,3
Urucum		
0,2 µg/mL	0,015	6,70 ± 3,8
0,5 µg/mL	0,040	9,00 ± 4,4
1,0 µg/mL	0,080	17,7 ± 0,6
2,0 µg/mL	0,150	19,3* ± 1,5
3,0 µg/mL	0,230	20,7* ± 2,9
4,0 µg/mL	0,300	31,7* ± 3,1

Em cada experimento (n=3) foram analisadas 2000 células binucleadas por tratamento.
Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
*estatisticamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,05$).

As concentrações de urucum testadas pelo Ensaio do Cometa foram 0,2, 0,5 e 1,0 µg/mL. O experimento incluiu um grupo controle negativo que se refere às culturas não tratadas, e um grupo solvente, que é o tratamento com DMSO a 0,4%.

A avaliação da extensão dos danos ao DNA causados pelo tratamento com urucum nas três concentrações analisadas e mensurados pelo parâmetro porcentagem de DNA na cauda (%DNA) está apresentada na Tabela 4. Os dados referentes aos parâmetros *Tail Moment* (TM) e *Olive Tail Moment* (OTM) estão apresentados no Anexo 3.

Os resultados obtidos pelo Ensaio do Cometa em células PC12 mostraram que as concentrações de urucum estudadas não foram genotóxicas. Como pode ser

observado na Tabela 4, as % DNA na cauda dos nucleóides de células PC12 tratadas com urucum ficaram próximas a do grupo controle, não apresentando diferenças significativas nas comparações entre estes grupos (p>0,05).

Tabela 4. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA) obtidos pelo Ensaio do Cometa em células PC12 sem tratamento (controle) e tratadas com urucum em diferentes concentrações

Grupo	**Conteúdo de Bixina no Urucum (µg/mL)**	**% DNA**	
		Média ± DP	**P**
Controle	—	10,5 ± 8,4	
Controle solvente	—	9,2 ± 2,9	> 0,05
Urucum			
0,2 µg/mL	0,015	6,9 ± 4,2	> 0,05
0,5 µg/mL	0,040	7,5 ± 1,4	> 0,05
1,0 µg/mL	0,080	9,5 ± 1,2	> 0,05

Em cada experimento (n=3) foram analisados 100 nucleóides/tratamento.
Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
P: teste de Tukey, médias comparadas ao grupo controle (p>0,05).

4.2.2 Avaliação antigenotóxica

A cisplatina foi mutagênica e não apresentou citotoxicidade às células PC12 na concentração de 0,1 µg/mL, por isso essa concentração foi usada para induzir danos às células em todos os experimentos que tinham como objetivo verificar o efeito protetor do urucum. Esse possível efeito protetor do urucum sobre os danos induzidos pela cisplatina foi analisado realizando um pré-tratamento com as três concentrações de urucum selecionadas anteriormente (0,2, 0,5 e 1,0 µg/mL) 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina.

Na avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT, pode-se observar uma resposta ao tratamento dose-dependente (Figura 16), se comportando da mesma maneira do tratamento apenas com o urucum (já apresentado na Figura 14).

Os tratamentos nas concentrações de 0,2 a 1,0 µg/mL (grupo URC + cDDP) não diferiram (p>0,05) do controle negativo e apresentaram no máximo 13% de redução na viabilidade celular. Os outros tratamentos foram significativamente diferentes (p<0,05) atingindo 22% de redução na viabilidade.

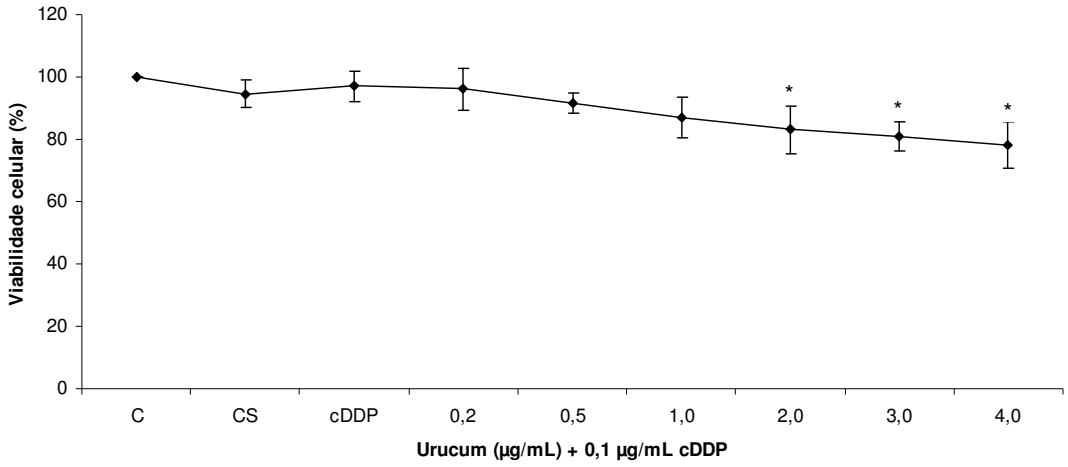


Figura 16. Avaliação do pré-tratamento com diferentes concentrações de urucum (0,2 a 4,0 µg/mL) 1 hora antes do tratamento com 0,1µg/mL de cisplatina em células PC12. C (controle) se refere às culturas não tratadas e consideradas com 100% de viabilidade. CS (controle solvente) se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO. *estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05).

No Teste do Micronúcleo foi analisada a capacidade do urucum em inibir a formação de MN induzidos pelo tratamento com a cisplatina.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram os valores médios de MN encontrados por 1000 células PC12 binucleadas tratadas com a associação de 0,2, 0,5 e 1,0 µg/mL de urucum e 0,1 µg/mL de cisplatina. Pode-se observar que os pré-tratamentos com urucum nas 3 concentrações analisadas inibiram de maneira

significativa (p<0,05) a indução de micronúcleos pela cisplatina. Essa inibição foi de aproximadamente 76,7%, 73,3% e 66,4%, respectivamente. Ainda, o pré-tratamento nas três concentrações resultou em frequência de micronúcleos superior ao controle negativo (p<0,05).

Tabela 5. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células PC12 binucleadas (BN) sem tratamento (controle) e pré-tratadas com diferentes concentrações de urucum 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina (cDDP)

Grupo	**Conteúdo de Bixina no Urucum (µg/mL)**	**MN/1000 BN média ± DP**
Controle	——	10,0 ± 3,6
Controle solvente	——	11,3 ± 2,3
cDDP		
0,1 µg/mL		80,0* ± 7,2
Urucum + 0,1µg/mL cDDP		
0,2 µg/mL	0,015	26,3*, ** ± 2,5
0,5 µg/mL	0,040	28,7*, ** ± 3,5
1,0 µg/mL	0,080	33,5*, ** ± 2,3

Em cada experimento (n=3) foram analisadas 2000 células BN/tratamento.
Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
*estatisticamente diferente em relação ao grupo controle (p<0,05).
** estatisticamente diferente em relação ao grupo cisplatina (cDDP) (p<0,05).

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados da %DNA obtida pelo Ensaio do Cometa. Os outros parâmetros (*Tail Moment* e *Olive Tail Moment*) estão apresentados no Anexo 4. O pré-tratamento com urucum (0,2, 0,5 e 1,0 µg/mL) foi realizado 1 hora antes do tratamento com a cisplatina, totalizando um tempo final de tratamento de 4 horas.

Foi possível observar que o tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina diminuiu a %DNA em relação ao grupo controle negativo. Os pré-tratamentos das culturas de células PC12 com urucum nas três concentrações selecionadas resultaram em %DNA maior do que a obtida nos grupos controle e cisplatina, entretanto em nenhuma situação houve diferenças estatisticamente significativas (p>0,05) entre os grupos, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA) obtidos pelo Ensaio do Cometa em células PC12 sem tratamento (controle), e pré-tratadas com urucum em diferentes concentrações 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina (cDDP)

Grupo	**Conteúdo de Bixina no Urucum (µg/mL)**	**% DNA**	
		Média ± DP	**P**
Controle	—	10,5 ± 8,4	
Controle solvente	—	9,2 ± 2,9	> 0,05
cDDP			
0,1 µg/mL	—	7,9 ± 0,9	> 0,05
Urucum + 0,1 µg/mL cDDP			
0,2 µg/mL	0,015	11,5 ± 4,6	> 0,05
0,5 µg/mL	0,040	8,8 ± 0,4	> 0,05
1,0 µg/mL	0,080	12,2 ± 10,6	> 0,05

Em cada experimento (n=3) foram analisados 100 nucleóides/tratamento.
Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
P: teste de Tukey, médias comparadas aos grupos controles e cisplatina (cDDP) (p>0,05).

4.3 Bixina

4.3.1 Avaliação citotóxica e genotóxica

A bixina foi avaliada quanto ao seu possível efeito citotóxico e genotóxico pelo método do MTT, Teste do Micronúcleo e Ensaio do Cometa.

Inicialmente, no método do MTT, as seguintes concentrações de bixina foram testadas para avaliar a sua viabilidade celular: 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 μg/mL. Esse ensaio incluiu, além do controle negativo, o controle do solvente, que é o tratamento com dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,4% usado como solvente para a bixina. O tempo de tratamento das culturas foi de 24 horas. No entanto, como mostrado na Figura 17, a viabilidade celular foi muito baixa (inferior a 35%) indicando que a bixina nestas concentrações foi citotóxica às células PC12 e que a resposta foi dose-dependente ($p<0,05$).

Dessa forma, as concentrações de 0,05, 0,08, 0,10, 0,30, 0,50, 0,80 e 1,00 μg/mL de bixina foram testadas. O tratamento das culturas foi de 24 horas e este ensaio também incluiu além do controle negativo, o controle do solvente (DMSO a 0,4%).

A Figura 18 apresenta a viabilidade celular dose-dependente do tratamento com bixina em células PC12. Apesar de todas as concentrações testadas diferirem significativamente do grupo controle ($p<0,05$), a partir da concentração 0,1 μg/mL houve uma queda acentuada na viabilidade. As culturas tratadas com concentrações acima de 0,3 μg/mL tiveram redução entre 52% e 65% na viabilidade celular. De acordo com estes resultados pode-se concluir que a bixina nas concentrações mais altas apresentou citotoxicidade.

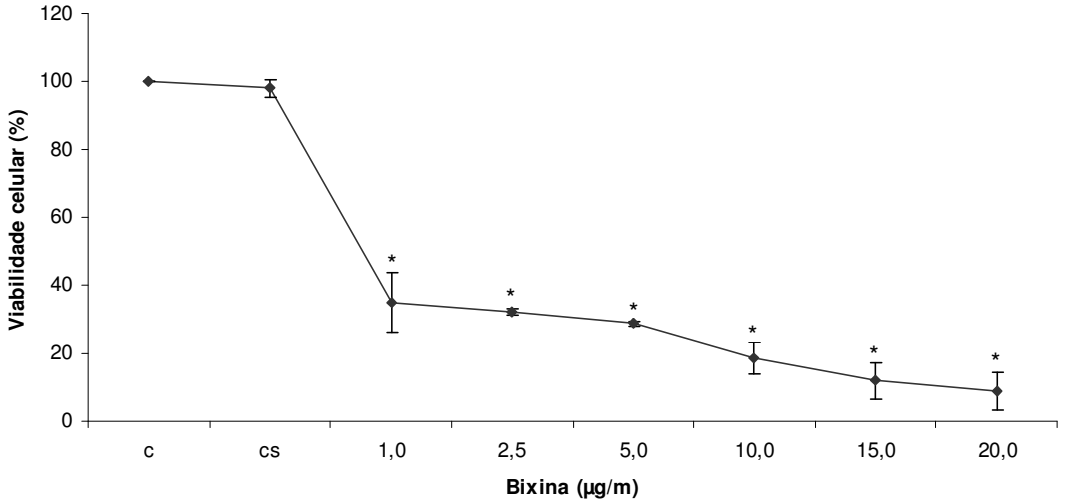


Figura 17. Avaliação do efeito citotóxico de concentrações inicialmente testadas de bixina em células PC12 (entre 1,0 e 20,0 µg/mL). C (controle) se refere às culturas não tratadas e consideradas com 100% de viabilidade. CS (controle solvente) se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO. *estatisticamente diferente do grupo controle ($p<0,05$).

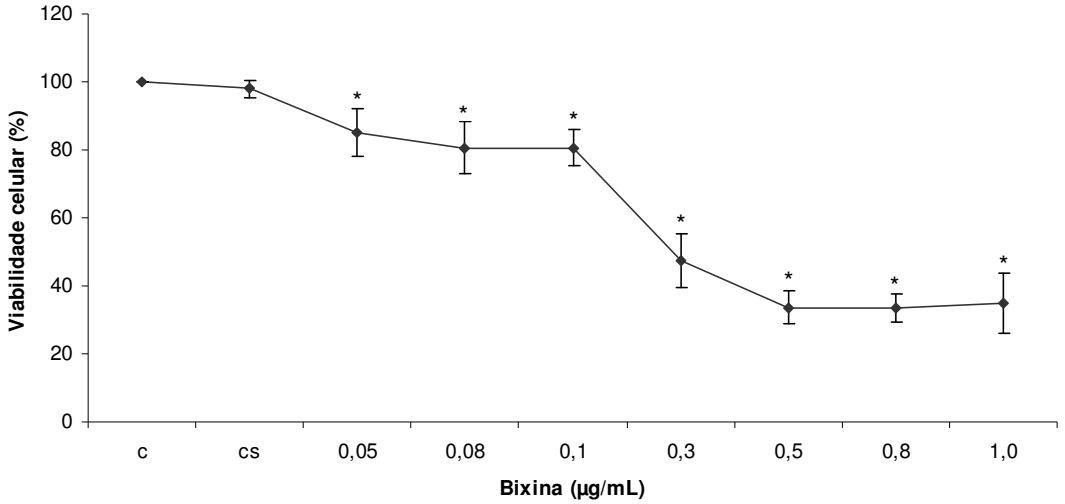


Figura 18. Avaliação do efeito citotóxico da bixina em células PC12. C (controle) se refere às culturas não tratadas e consideradas com 100% de viabilidade. CS (controle solvente) se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO. *estatisticamente diferente do grupo controle ($p<0,05$).

O Teste do Micronúcleo (MN) teve como objetivo estabelecer a extensão dos danos cromossômicos induzidos por diferentes concentrações de bixina (0,05, 0,08 e 0,10 µg/mL) em células PC12, avaliando a porcentagem de células binucleadas (BN), o índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) e a frequência de micronúcleos (MN) em células PC12 BN. O experimento incluiu um grupo controle que se refere às culturas não tratadas, e um grupo solvente, que é o tratamento com DMSO a 0,4%.

A tabela 7 apresenta os dados de distribuição de células de acordo com o número de núcleos e a porcentagem de células binucleadas (%BN). É possível observar que todas as concentrações testadas obtiveram número suficiente de células BN para a análise da freqüência de MN, que não deve ser inferior a 35% (Fenech, 2000).

Tabela 7. Distribuição de células de acordo com o número de núcleos em cultura de células PC12 tratadas com diferentes concentrações de bixina submetidas ao Teste do Micronúcleo (MN)

Tratamentos	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos				% BN
	1	2	3	4	
Controle	181	314	5	0	63
Controle solvente	183	310	7	0	62
Bixina					
0,05 µg/mL	188	309	3	0	62
0,08 µg/mL	202	294	4	0	59
0,10 µg/mL	241	256	3	0	51

Em cada experimento (n=3) foram analisadas 500 células por tratamento. %BN: porcentagem de células binucleadas. Controle: culturas não tratadas e consideradas com 100% de viabilidade. Controle solvente: culturas tratadas com 0,4% de DMSO.

Os resultados da análise do índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) apresentados na Figura 19 mostram que os tratamentos com bixina nas concentrações testadas não resultaram em variações nos valores de IPBC quando comparadas com o grupo controle negativo, não apresentando diferenças significativas nessas comparações (p>0,05).

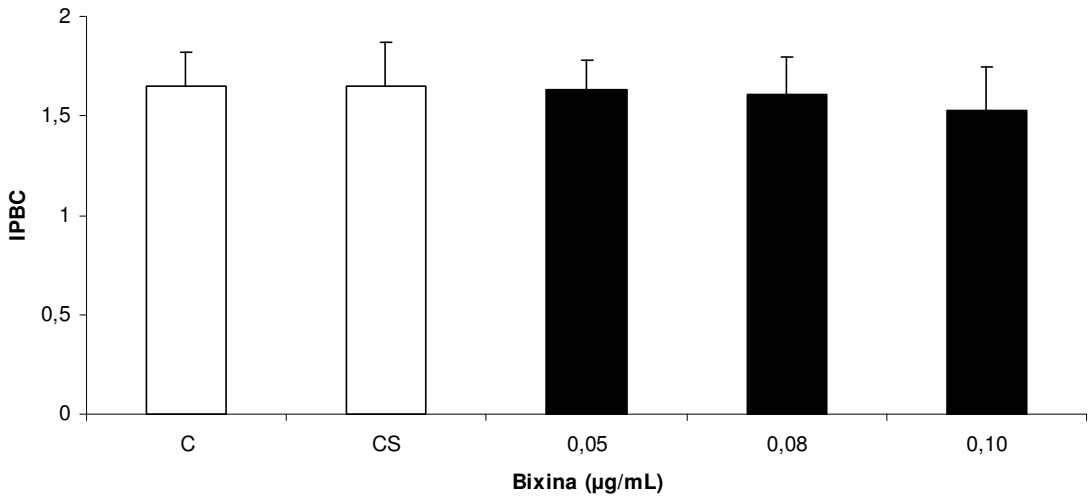


Figura 19. Índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células PC12 tratadas com bixina nas concentrações de 0,05, 0,08 e 0,10 µg/mL. Em cada experimento (n=3) foram analisadas 500 células por tratamento. C: controle negativo. CS: controle solvente (0,4% de DMSO).

A Tabela 8 apresenta os valores médios do número de MN encontrados por 1000 células PC12 BN tratadas com bixina e os seus controles.

Os tratamentos com bixina nas três concentrações estudadas não aumentaram de maneira relevante o número de MN, não apresentando diferenças significativas (p>0,05).

Tabela 8 Valores médios ± Desvio Padrão (DP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células PC12 binucleadas (BN) sem tratamento (controle) e tratadas com bixina em diferentes concentrações

Grupo	**MN/1000 BN** **média ± DP**
Controle	11 ± 0,6
Controle solvente	14 ± 1,5
Bixina	
0,05 µg/mL	9 ± 1,5
0,08 µg/mL	12 ± 1,0
0,10 µg/mL	18 ± 6,5

Em cada experimento (n=3) foram analisadas 2000 células BN/tratamento.
Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
Não houve diferença estatística entre os grupos bixina e o grupo controle (p>0,05).

A determinação da extensão de danos ao DNA causados pela bixina nas concentrações 0,05, 0,08 e 0,10 µg/mL em células PC12 foi avaliada também pelo Ensaio do Cometa utilizando o parâmetro porcentagem de DNA na cauda (%DNA). O tratamento foi de 4 horas.

Na Tabela 9 estão apresentados a %DNA dos grupos controle, controle do solvente (0,4% de DMSO) e bixina nas três concentrações analisadas (0,05, 0,08 e 0,10 µg/mL). Os dados referentes aos parâmetros *Tail Moment* e *Olive Tail Moment* estão apresentados no Anexo 5. Em todos os tratamentos os resultados obtidos foram inferiores ao do grupo controle, porém apenas o tratamento com 0,10 µg/mL de bixina apresentou diferença significativa (p<0,05).

Tabela 9. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA) obtidos pelo Ensaio do Cometa em células PC12 sem tratamento (controle) e tratadas com bixina em diferentes concentrações

Grupo	% DNA	
	Média ± DP	**P**
Controle	23,3 ± 6,7	
Controle solvente	18,3 ± 10,0	> 0,05
Bixina		
0,05 µg/mL	12,4 ± 3,0	> 0,05
0,08 µg/mL	8,5 ± 3,3	> 0,05
0,10 µg/mL	7,5* ± 2,5	< 0,05

Em cada experimento (n=3) foram analisados 100 nucleóides/tratamento.
Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
P: teste de Tukey, médias comparadas ao grupo controle.
*estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05)

4.3.2 Avaliação antigenotóxica

A bixina foi utilizada para verificar seu possível efeito protetor sobre a genotoxicidade induzida pela cisplatina nas células PC12. Para isso, foi realizado um pré-tratamento com as três concentrações de bixina selecionadas anteriormente (0,05; 0,08 e 0,10 µg/mL) 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina.

Na avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT, pode-se observar uma resposta ao tratamento dose-dependente (Figura 20). Em todas as concentrações de bixina analisadas foi possível observar leve diminuição da viabilidade celular quando associadas à cisplatina, mas apenas o tratamento 0,05 µg/mL (grupo BXN + cDDP) não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle (p>0,05). A redução da viabilidade celular foi de 22% na concentração mais alta.

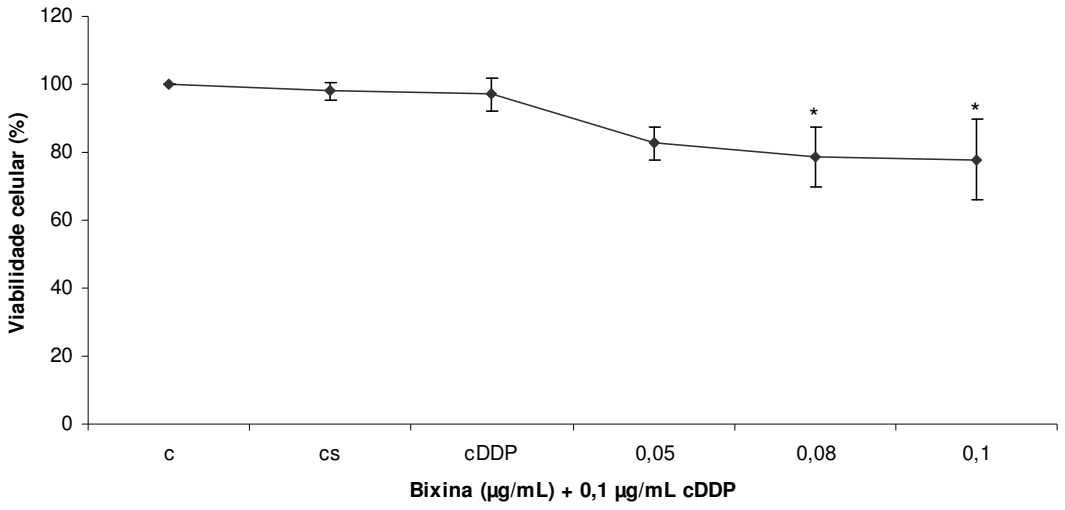


Figura 20. Avaliação do efeito citotóxico do pré-tratamento com diferentes concentrações de bixina (0,05, 0,08 e 0,10 µg/mL) 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina em células PC12. C (controle) se refere às culturas não tratadas e consideradas com 100% de viabilidade. CS (controle solvente) se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO. *estatisticamente diferente do grupo controle ($p<0,05$).

No Teste do Micronúcleo foi analisada a capacidade da bixina em inibir a formação de danos cromossômicos induzidos pela cisplatina.

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram os valores médios de MN encontrados por 1000 células PC12 binucleadas tratadas com a associação de 0,05, 0,08 e 1,0 µg/mL de bixina com 0,1 µg/mL de cisplatina. Pode-se observar que, apesar do pré-tratamento com bixina ter apresentado um aumento no número de MN em relação ao grupo controle ($p<0,05$), houve uma inibição da formação de MN quando comparado ao tratamento somente com cisplatina ($p<0,05$).

Tabela 10. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) do número de micronúcleos (MN) por 1000 células PC12 binucleadas (BN) sem tratamento (controle) e pré-tratadas com diferentes concentrações de bixina 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina (cDDP)

Grupo	**MN/1000 BN** **média ± DP**
Controle	11 ± 0,6
Controle solvente	14 ± 1,5
cDDP	
0,1 µg/mL	80* ± 7,2
Bixina + 0,1 ug/mL cDDP	
0,05 µg/mL	40*, ** ± 6,2
0,08 µg/mL	28*, ** ± 2,1
0,10 µg/mL	26*, ** ± 1,0

Em cada experimento (n=3) foram analisadas 2000 células BN/tratamento.
Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
*estatisticamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,05$).
** estatisticamente diferente em relação ao grupo cisplatina (cDDP) ($p<0,05$).

No Ensaio do Cometa o efeito protetor da bixina sobre os danos induzidos pela cisplatina nas células PC12 foi avaliado pelo parâmetro porcentagem de DNA na cauda (%DNA). O pré-tratamento com bixina foi realizado 1 hora antes do tratamento com a cisplatina, totalizando um tempo final de tratamento de 4 horas.

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da %DNA dos grupos controle negativo, cisplatina e bixina associada à cisplatina. Os dados referentes aos parâmetros *Tail Moment* (TM) e *Olive Tail Moment* (OTM) estão apresentados no Anexo 6. O tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina diminuiu a % DNA em relação

ao grupo controle. Este comportamento foi observado também nos parâmetros TM e OTM (Anexo 6), porém não apresentou diferença significativa (p>0,05). Os pré-tratamentos das culturas de células PC12 com bixina nas três concentrações resultaram em % DNA menores do que os obtidos nos grupos controle e cisplatina, entretanto, em nenhuma situação houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p>0,05), como pode ser observado na Tabela 11.

Nenhum grupo apresentou diferença significativa (p>0,05) quando comparado ao grupo controle no parâmetro %DNA na cauda.

Tabela 11. Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA) obtidos pelo Ensaio do Cometa em células PC12 sem tratamento (controle), e pré-tratadas com bixina em diferentes concentrações 1 hora antes do tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina (cDDP)

Grupo	**% DNA**	
	Média ± DP	**P**
Controle	23,3 ± 6,7	
Controle solvente	18,3 ± 10,0	> 0,05
cDDP		
0,1 ug/mL	16,5 ± 10,1	> 0,05
Bixina + 0,1 µg/mL cDDP		
0,05 µg/mL	11,3 ± 7,3	> 0,05
0,08 µg/mL	8,5 ± 3,3	> 0,05
0,10 µg/mL	6,4 ± 2,0	> 0,05

Em cada experimento (n=3) foram analisadas 100 nucleóides/tratamento.
Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
P: teste de Tukey, médias comparadas aos grupos controles e cisplatina (cDDP) (p>0,05).

4.4 Análise comparativa entre o Urucum e a Bixina

Foi realizada uma análise comparativa dos resultados do urucum e da bixina obtidos no Teste do Micronúcleo e no Ensaio do Cometa. Vale ressaltar que as concentrações 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL de urucum correspondem a 0,015, 0,04, 0,08 e 0,15 µg/mL de bixina, respectivamente.

4.4.1 Genotoxicidade do urucum e da bixina

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados obtidos no Teste do Micronúcleo e no Ensaio do Cometa realizados com o urucum (0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL) e com a bixina (0,05, 0,08 e 0,10 µg/mL).

No Teste do Micronúcleo, em uma análise comparativa entre o grupo urucum e o grupo bixina foi possível observar que os dois grupos apresentaram tendência semelhante, aumentando a frequência de micronúcleos com o aumento da concentração testada.

No Ensaio do Cometa a resposta ao tratamento foi de forma inversa. Enquanto no grupo urucum, com o aumento da concentração, ocorreu aumento dos danos às células Pc12, no grupo bixina ocorreu diminuicão dos danos. Esses resultados, no entanto, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 12. Análise comparativa do urucum e da bixina em relação aos resultados obtidos no Teste do Micronúcleo (MN) e do Ensaio do Cometa em células PC12

Grupo	Conteúdo de Bixina no Urucum (µg/mL)	MN/1000 BN	% DNA
		Média ± DP	Média ± DP
Urucum			
Controle	—	10,0 ± 3,6	10,5 ± 8,4
0,2 µg/mL	0,015	6,7 ± 3,8	6,9 ± 4,2
0,5 µg/mL	0,040	9,0 ± 4,4	7,5 ± 1,4
1,0 µg/mL	0,080	17,7 ± 0,6	9,5 ± 1,2
2,0 µg/mL	0,150	19,3* ± 1,5	
Bixina			
Controle	—	11,0 ± 0,6	23,3 ± 6,7
0,05 µg/mL	—	9,0 ± 1,5	12,4 ± 3,0
0,08 µg/mL	—	12,0 ± 1,0	8,5 ± 3,3
0,10 µg/mL	—	18,0 ± 6,5	7,5# ± 2,5

No teste do micronúcleo os valores são expressos em média ± desvio padrão de 1000 células binucleadas (BN). Foram analisadas 2000 células BN/tratamento. *estatisticamente diferente em relação ao grupo controle do urucum ($p<0,05$). No Ensaio do Cometa os valores são expressos em média ± desvio padrão de 100 nucleóides analisados. #estatisticamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,05$). Controle se refere às culturas não tratadas. Os resultados do urucum e da bixina foram obtidos de experimentos realizados em momentos diferentes.

4.4.2 Antigenotoxicidade do urucum e da bixina

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados da análise comparativa do Teste do Micronúcleo e do Ensaio do Cometa dos pré-tratamentos com urucum (0,2, 0,5 e 1,0 μg/mL) e com bixina (0,05, 0,08 e 0,10 μg/mL) 1 hora antes do tratamento com 0,1 μg/mL de cisplatina.

No Teste do Micronúcleo foi possível observar que tanto os resultados do urucum quanto os resultados da bixina foram diferentes estatisticamente ($p<0,05$) em relação aos seus grupos controle e cisplatina. Os dois grupos protegeram as células PC12 dos danos cromossômicos induzidos pela cisplatina. A porcentagem de proteção encontrada no grupo urucum ficou entre 66% e 77%, sendo a maior porcentagem de proteção encontrada na menor concentração testada. O grupo bixina apresentou porcentagem de proteção entre 50% e 75%, sendo a maior porcentagem de proteção encontrada na maior concentração testada.

No Ensaio do Cometa não houve diferença significativa ($p>0,05$) tanto entre os resultados do urucum quanto os resultados da bixina em relação aos seus grupos controle e cisplatina. O grupo urucum apresentou resultados próximos ao seu grupo controle. Já o grupo bixina apresentou resultados inferiores aos encontrados nos grupos controle negativo e cisplatina ($p>0,05$). Com o aumento da concentração testada houve diminuição da %DNA.

Tabela 13. Análise comparativa dos pré-tratamentos com urucum e com bixina 1 hora antes do tratamento com cisplatina (cDDP) em relação aos resultados obtidos no Teste do Micronúcleo (MN) e no Ensaio do Cometa em células PC12.

Grupo	**Conteúdo de Bixina no Urucum (µg/mL)**	**MN/1000 BN**	**% DNA**
		Média ± DP	**Média ± DP**
Urucum			
Controle	—	10,0 ± 3,6	10,5 ± 8,4
cDDP 0,1 µg/mL		80,0* ± 7,2	7,9 ± 0,9
Urucum + 0,1 µg/mL cDDP			
0,2 µg/mL	0,015	26,3*, ** ± 2,5	11,5 ± 4,6
0,5 µg/mL	0,040	28,7*, ** ± 3,5	8,8 ± 0,4
1,0 µg/mL	0,080	33,5*, ** ± 2,3	12,2 ± 10,6
Bixina			
Controle		11,0 ± 0,6	23,3 ± 6,7
cDDP 0,1 µg/mL	—	80,0# ± 7,2	16,5 ± 10,1
Bixina + 0,1 µg/mL cDDP			
0,05 µg/mL	—	40,0#, ## ± 6,2	11,3 ± 7,3
0,08 µg/mL	—	28,0#, ## ± 2,1	8,5 ± 3,3
0,10 µg/mL	—	26,0#, ## ± 1,0	6,4 ± 2,0

No teste do micronúcleo os valores são expressos em média ± desvio padrão de 1000 células binucleadas (BN). Foram analisadas 2000 células BN/tratamento. * e **estatisticamente diferente em relação ao grupo controle e ao grupo cisplatina do urucum ($p<0,05$). No Ensaio do Cometa os valores são expressos em média ± desvio padrão de 100 nucleóides analisados. # e ##estatisticamente diferente em relação ao grupo controle e ao grupo bixina ($p<0,05$). Controle se refere às culturas não tratadas. Os resultados do urucum e da bixina foram obtidos de experimentos realizados em momentos diferentes.

Discussão

5 DISCUSSÃO

A cisplatina é comumente usada contra muitas formas de câncer há aproximadamente 40 anos. Entretanto, sua aplicação é associada a vários efeitos colaterais, como neurotoxicidade, nefrotoxicidade, perda da audição e vômitos (WEIJL, CLETON, OSANTO, 1997). Este fármaco produz seus efeitos antineoplásicos pela ligação direta ao DNA, resultando em ligações cruzadas e apoptose nas células que estão se dividindo rapidamente, mas como os neurônios são pós-mitóticos, o mecanismo pelo qual ele induz neuropatia não está claro (MCDONALD, SOHAL, FORSTER, 2005a; PISANO et al., 2003; HUANG et al., 1995). Os efeitos neurotóxicos podem ser graves e afetar a qualidade de vida dos pacientes, mesmo muito tempo depois que o tratamento tenha terminado.

Partiu-se da hipótese de que a neuropatia periférica induzida pela cisplatina possa ser resultante, ao menos em parte, de um estresse oxidativo. Desta maneira, uma substância antioxidante capaz de neutralizar a ação das espécies reativas de oxigênio formadas durante o tratamento, resultaria na redução da ação tóxica da cisplatina sobre as células saudáveis.

Muitos compostos têm sido testados para tentar bloquear ou reverter as neuropatias induzidas na quimioterapia. Estes incluem fatores neurotróficos ou neuroprotetores, tais como fator de crescimento neuronal (NGF) (HAYAKAWA et al., 1998), fator-1 de crescimento semelhante a insulina (IGF1) (CONTRERAS et al., 1997), eritropoietina (BIANCHI et al., 2006; ORHAN et al., 2004) e fator inibitório de leucemia (LIF) (OZTURK et al., 2005), todos os quais mostraram melhora em uma variedade de modelos. Porém, seus usos clínicos são limitados devido à dificuldade na administração da droga, estabilidade, efeitos colaterais deletérios ou ineficácia nos testes clínicos humanos (DAVIS et al., 2005). Vários trabalhos com

antioxidantes, como o carotenóide bixina e as vitaminas C e E, relataram efeito protetor sobre os efeitos antigenotóxicos, neurotóxicos e nefrotóxicos induzidos pela cisplatina (ANTUNES et al., 2005; ANTUNES, BIANCHI, 2004; LEONETTI et al., 2003; PACE et al., 2003; NEFIC, 2001).

Leonetti et al. (2003) observaram que o alfa-tocoferol apresentou proteção contra a toxicidade sistêmica e a neurotoxicidade induzida pela cisplatina sem interferir com sua atividade antitumoral. Nefic (2001) sugeriu que a vitamina C tem algum papel protetor, por agir como antioxidante, nos danos induzidos por radicais livres gerados durante a atividade metabólica da cisplatina em células somáticas humanas. Pace et al. (2003) verificaram que a suplementação com vitamina E em pacientes que estavam recebendo quimioterapia com cisplatina, diminuiu a incidência e a gravidade da neurotoxicidade periférica.

No presente estudo foram avaliados os efeitos protetores do urucum e da bixina sobre os danos ao DNA induzidos pela cisplatina em células PC12, utilizando para isso, testes de citotoxicidade pelo Método MTT, e de genotoxicidade de lesões primárias ao DNA e de quebras ou perdas cromossômicas analisada pelo Ensaio do Cometa e Teste do Micronúcleo, respectivamente.

As células PC12 (feocromocitoma de ratos) foram utilizadas como um modelo de estudo neuronal e possuem várias vantagens sobre as culturas de células neuronais primárias, incluindo a homogeneidade da população celular (COLOGNATO et al., 2006). É uma das linhagens celulares neuronais mais frequentemente usadas e tem sido empregada com sucesso ao longo dos anos para estudos de funções neuronais (PIGA et al., 2007).

O urucum é uma das maiores fontes naturais de corantes vermelhos. Os principais carotenóides presentes nas sementes de urucum são a bixina e a

norbixina, mas também estão presentes β-caroteno, criptoxantina, luteína e zeaxantina (TIRIMANNA, 1981). Os carotenóides são considerados eficazes agentes antioxidantes, antimutagênicos e anticarcinogênicos (ANTUNES et al., 2005).

A bixina pode contribuir para a proteção das células e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres (SANTOS et al., 2007; DI MASCIO, DEVASAGAYAM, SIES, 1990) por ser um eficaz seqüestrador da molécula de oxigênio singlete e, dessa forma, tem a possibilidade de ser um promissor agente quimioprotetor especialmente sobre os danos ao DNA induzidos por radicais livres de oxigênio ou compostos capazes de gerar tais moléculas.

Cisplatina como indutora de danos em células PC12

A cisplatina é uma droga que se liga ao DNA formando ligações cruzadas e a quantidade de ligações cruzadas no DNA está relacionada com sua citotoxicidade nas células tumorais, que são particularmente suscetíveis devido ao alto índice mitótico, bem como pela diminuição na capacidade em reparar os danos no DNA (KLEIN, BROWN, TURNLEY, 2007; KOBERLE et al., 1997). A ligação da cisplatina ao DNA também resulta em danos a um grande número de genes, influenciando a transcrição e conseqüentemente, o metabolismo geral da célula (KLEIN, BROWN, TURNLEY, 2007).

O mecanismo pelo qual a cisplatina afeta os neuritos é ainda desconhecido, mas pode ser resultado de vários efeitos nas sinalizações intracelulares devido aos danos causados ao DNA pelo quimioterápico (KLEIN, BROWN, TURNLEY, 2007). McDonald et al. (2005) verificaram que a cisplatina causa apoptose nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) e forma mais adutos com o DNA nestas células, que são pós-mitóticas, do que em células PC12.

No presente trabalho, para estabelecer as concentrações experimentais eficazes da cisplatina nas células PC12, várias concentrações foram separadamente testadas pelo método MTT e pelo Teste do Micronúcleo (MN). A concentração de cisplatina estabelecida deveria ser capaz de induzir genotoxicidade sem ser citotóxica.

O método MTT foi utilizado para verificar a viabilidade celular dos agentes testados. Este método se baseia na redução do sal tetrazolato nas mitocôndrias das células metabolicamente ativas, formando cristais azulados que depois de solubilizados serão analisados por espectrofotometria. Dessa forma, é possível determinar a proporção de células viáveis após o tratamento (MOSMANN, 1983). As concentrações de cisplatina testadas pelo MTT foram estabelecidas por meio de uma revisão da literatura, em que se observou uma grande variação de concentrações utilizadas (OZTURK et al., 2007; MCDONALD et al., 2005b; DONZELLI et al., 2004; PISANO et al., 2003; GILL, WINDEBANK, 1998).

PISANO et al. (2003) para avaliar a acetil-L-carnitina como substância neuroprotetora, trataram células PC12 com 10 µg/mL de cisplatina e observaram indução de toxicidade. Em células A549, de câncer de pulmão, 1 µg/mL de cisplatina reduziu 25% a viabilidade celular (OZTURK et al., 2007). Na linhagem celular SH-SY5Y, de neuroblastoma humano, 4,5 µg/mL de cisplatina reduziu 50% da viabilidade celular (DONZELLI et al., 2004). Estes resultados demonstraram a importância de se estabelecer a concentração ideal de cisplatina para as células PC12, já que sua citotoxicidade pode variar nas diferentes linhagens celulares. A partir destes estudos foram testadas concentrações acima e abaixo de 10 µg/mL para serem avaliadas pelo método do MTT.

Dessa forma, as concentrações de cisplatina escolhidas neste trabalho para o teste do MTT foram entre 0,1 e 150,0 μg/mL. Além dos tratamentos, o experimento incluiu um grupo controle negativo (culturas não tratadas) e este foi considerado com 100% de viabilidade celular.

O resultado da viabilidade das células PC12 após a exposição à cisplatina foi dose-dependente, sendo possível observar que em concentrações até 5 μg/mL a redução da viabilidade celular foi abaixo de 10%. Já em tratamentos acima de 15 μg/mL a redução da viabilidade celular foi mais expressiva, acima de 20%, sendo significativamente diferente do grupo controle negativo. Esses resultados estão de acordo com os apresentados por LeFevre et al. (2007), que observaram viabilidade celular de 88,7%, 80,0% e 38,5% no tratamento com 0,1 μg/mL, 1,0 μg/mL e 100,0 μg/mL de cisplatina, respectivamente, em células de linfoblastoma humano TK6. Como já mencionado anteriormente, a concentração de cisplatina normalmente encontrada no plasma de pacientes é de 35 μM, o que corresponde a 10,5 μg/mL (Dimanche-Boitrel et al., 2005). É interessante observar que, neste estudo, a concentração de 10 μg/mL apresentou aproximadamente 80% de viabilidade celular, porém no Teste do Micronúcleo a porcentagem de células binucleadas não foi suficiente para análise (inferior a 35%).

Cho et al (2008) analisaram a sobrevivência celular e a citotoxicidade mediada pela cisplatina em células MEF (fibroblasto embrionário murino) de ratos do tipo selvagem e de ratos com deficiência do sistema antioxidante *nrf2*. Eles observaram que a concentração de cisplatina que inibiu 50% da sobrevivência celular (IC_{50}) foi 1,9 μg/mL nas células do tipo selvagem e de 0,5 μg/mL nas células deficientes de *nrf2*, mostrando que estas são muito mais sensíveis ao tratamento com cisplatina. Naruse, Nishida e Ishiguro (2007) avaliaram a citotoxicidade da

cisplatina em células MG-63 de osteosarcoma utilizando o método MTT, e observaram uma IC_{10} (concentração que inibe o crescimento das células em 10%) de aproximadamente 2 μg/mL, e uma IC_{20} de aproximadamente 5 μg/mL.

A partir dos dados de citotoxicidade obtidos para a cisplatina em células PC12, foram selecionadas as concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 μg/mL para serem avaliadas quanto à indução de danos cromossômicos. A genotoxicidade das concentrações selecionadas foi verificada utilizando os parâmetros de porcentagem de células binucleadas (BN), índice de proliferação de células com bloqueio da citocinese (IPBC) e a análise da freqüência de micronúcleos (MN).

O Teste do Micronúcleo é uma importante ferramenta para se analisar danos cromossômicos e atualmente tem sido desenvolvido para a avaliação de micronúcleos em diversos tipos celulares, sendo que vários trabalhos já apresentaram resultados nesse sentido. Cao et al. (2007) avaliaram os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos da curcumina em células HepG2 e verificaram que em altas concentrações (acima de 8,0 μg/mL) houve um pequeno, mas significativo aumento na frequência de micronúcleos e que em concentrações menores (abaixo de 2,0 μg/mL) a formação de micronúcleos foi significativamente reduzida quando comparados ao tratamento com o quimioterápico ciclofosfamida. Liu et al. (2007) avaliaram alterações cromossômicas pelo Teste do Micronúcleo em células HLFK (linhagem celular deficiente da proteína Ku70) e HLFC (linhagem celular vetor nulo). Rosa et al. (2007) também verificaram a propriedade antimutagência do difenil diselenida (DPDS) por meio do Teste do Micronúcleo em células V79 de hamster chinês. É interessante ressaltar que a análise de micronúcleos em células PC12 binucleadas ainda não possui relatos na literatura.

Segundo Fenech (2000), para a análise de micronúcleo as culturas devem apresentar um porcentual de células BN acima de 35%. Neste trabalho, as concentrações de cisplatina testadas em células PC12 acima de 0,5 µg/mL resultaram em porcentual muito baixo de células BN e apenas o tratamento com 0,1 µg/mL resultou em um número de células BN suficientes para a análise de MN. A análise do IPBC confirmou estes dados, pois todos os tratamentos com cisplatina reduziram significativamente o seu valor, sendo que a concentração de 0,1 µg/mL apresentou a menor redução. Devido à porcentagem de células BN e levando-se em conta o IPBC, que é um índice de estimativa de citotoxicidade, apenas a concentração de 0,1 µg/mL foi analisada quanto à indução de micronúcleos.

A cisplatina já foi testada em várias concentrações e tipos celulares quanto à indução de micronúcleos. Rodilla et al. (1990), testaram concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL de cisplatina em culturas de células de ovário de hamster chinês (CHO), e observaram uma grande indução de micronúcleos (entre 30 e 220 MN por 1000 células BN). Marzano et al. (2004), testaram concentrações de 7,5 e 15 µg/mL de cisplatina em culturas de linfócitos, e obtiveram indução de aproximadamente 14 e 36 micronúcleos por 1000 células BN, respectivamente. Kosmider et al. (2004), também trataram culturas de linfócitos com cisplatina nas concentrações de 0,3, 0,75, 1,5 e 2,25 µg/mL, resultando em freqüência de micronúcleos dose-dependente (21,0, 55,0, 115,0 e 122 MN/1000 células BN, respectivamente). LeFevre et al. (2007) avaliaram a genotoxicidade da cisplatina em três concentrações (0,1; 1,0 e 100,0 µg/mL) em células de linfoblastóide humano TK6 e observaram 15,2 micronúcleos por 1000 células BN na menor concentração, sendo que nas duas outras a frequência de micronúcleos foi a mesma (29 micronúcleos por 1000 células BN).

No presente estudo com células PC12 o tratamento com 0,1 µg/mL de cisplatina resultou na freqüência média de 80 micronúcleos por 1000 células BN, diferindo significativamente do grupo controle negativo que apresentou 11 micronúcleos por 1000 células BN. A frequência de micronúcleos no grupo controle negativo foi superior do que a geralmente encontrada em culturas de linfócitos humanos, mas isso já era esperado, pois as células PC12 constituem uma linhagem de células transformadas. Os resultados obtidos mostraram que as culturas de células PC12 foram bastante sensíveis à cisplatina. Dessa forma, a concentração de 0,1 µg/mL de cisplatina foi a escolhida para ser usada como indutora de danos às células PC12, devido a três fatores: sua baixa citotoxicidade, número de células binucleadas suficientes para análise e alta indução de micronúcleos nas células PC12.

Potencial antigenotóxico do urucum e da bixina

Neste trabalho foram avaliadas tanto a genotoxicidade como a antigenotoxicidade do urucum e da bixina e também a sua citotoxicidade. Segundo Zeiger (2007), para que uma substância possa ser classificada como antigenotóxica/antimutagênica, ela deve primeiro ser avaliada quanto a sua genotoxicidade/mutagenicidade. Dessa forma, a citotoxicidade do urucum e da bixina foram avaliadas, e concentrações não citotóxicas foram testadas quanto ao potencial genotóxico pelos ensaios do Micronúcleo e do Cometa, antes de sua avaliação como agente protetor.

Na avaliação da citotoxicidade do urucum e da bixina em células PC12 os resultados obtidos neste estudo indicaram que a viabilidade celular aos tratamentos ocorreu de maneira dose-dependente.

As concentrações de 3,0 e 4,0 μg/mL de urucum foram significativamente diferentes do grupo controle negativo, com redução de até 27% na viabilidade celular. Neste caso, como a maior concentração testada foi 4,0 μg/mL, apresentando viabilidade de 73%, não é possível afirmar que o urucum é citotóxico às células PC12, mas apresenta uma tendência de citotoxicidade dose-dependente.

Com relação à bixina, apesar de todas as concentrações testadas diferirem significativamente do grupo controle negativo, a partir da concentração 0,1 μg/mL, que apresentou 80,7% de viabilidade, foi possível notar uma queda acentuada da viabilidade celular. Apenas entre as concentrações de 0,1 μg/mL e 0,3 μg/mL, a redução da viabilidade foi de 33,2%, sendo que a maior concentração analisada (20,0 μg/mL) apresentou somente 9,0% de viabilidade celular. É importante ressaltar que a bixina, do mesmo modo que outros fitoquímicos da dieta, possui atividade pró-oxidante, assim como seus efeitos antioxidantes, dependendo da dose e do ambiente químico, isto é, disponibilidade de metais como ferro e cobre.

O balanço entre as atividades antioxidante e pró-oxidante é uma consideração importante no planejamento de intervenções clínicas, principalmente se a sua atividade resultar em efeitos deletérios potenciais, tais como a indução de adutos e quebras nas cadeias do DNA (SHARMA, GESCHER, STEWARD, 2005). Vários estudos vêm sendo realizados para determinar a dose diária ideal de β-caroteno que pode ser administrada para o ser humano. O aumento do interesse nestes estudos é justificado principalmente, pelos resultados de duas grandes pesquisas envolvendo trabalhadores de fábricas de asbestos e fumantes (ATBC, 1994; OMENN, 1994). Estas pesquisas mostraram um aumento na incidência de câncer de pulmão nestes grupos de pessoas, quando eram administradas elevadas doses diárias de β-caroteno (20 e 30mg). Por outro lado, um estudo feito com a

aplicação de uma dose diária ainda maior de β-caroteno (50mg), não mostrou aumento na incidência de câncer entre os pacientes, que eram na maioria, não-fumantes (HENNEKENS, 1996). Portanto, mais estudos devem ser feitos para analisar a dose efetiva e segura dos carotenóides, para que haja a promoção da saúde daqueles que se alimentam de produtos que contenham carotenóides como principal corante.

Para estabelecer a extensão dos danos induzidos pelo urucum e pela bixina em células PC12 foram realizados o Teste do Micronúcleo e o Ensaio do Cometa. Estes métodos diferem basicamente devido ao tipo de alterações ao DNA detectadas. O Teste do Micronúcleo detecta lesões não reparadas que se manifestam como quebras ou perdas cromossômicas, enquanto o Ensaio do Cometa detecta lesões primárias no DNA, que ainda podem ser reparadas.

Todas as concentrações de urucum e de bixina testadas nas células PC12 resultaram em porcentagem de células BN acima de 35%, sendo suficientes para a realização da análise de micronúcleos.

Apenas as concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0 μg/mL de urucum não alteraram significativamente o IPBC e apresentaram freqüência de micronúcleos próxima a do grupo controle negativo, não diferindo estatisticamente. Porém, os tratamentos acima destas concentrações resultaram em IPBC significativamente diferente do controle negativo com redução de até 26% e freqüência de micronúcleos significativamente superior a do grupo controle. Portanto, nas condições aqui estudadas, é provável que o urucum em concentrações acima de 2,0 μg/mL possa ser mutagênico. No entanto, em um estudo *in vivo*, Alves de Lima et al. (2003) avaliaram os efeitos mutagênicos e antimutagênicos do urucum em células da

medula óssea de camundongos machos Swiss, e concluíram que o urucum não apresentou propriedades mutagênicas neste modelo estudado.

Em comparação ao grupo controle negativo, o IPBC da bixina em todas as concentrações testadas não apresentou variações significativas e a freqüência de micronúcleos foi discretamente mais elevada nos grupos tratados, não diferindo estatisticamente. Dessa forma, as concentrações estudadas de bixina não foram consideradas mutagênicas às células PC12.

O Ensaio do Cometa detecta danos ao DNA tais como quebras de fitas simples e duplas, sítios álcali lábeis, locais de reparo incompleto e instabilidade genômica (NESSLANY et al., 2007). Este ensaio pode ser analisado de duas formas: visual ou por meio de programas específicos. O desenvolvimento de programas de análise aprimorou a técnica por evitar a subjetividade presente na análise visual. No entanto, como existem vários programas disponíveis, os parâmetros de análise do Ensaio do Cometa podem apresentar divergências na medida do dano basal quando for realizada uma comparação entre dados obtidos por programas diferentes.

O Ensaio do Cometa tem mostrado ser muito sensível e é, portanto, útil para a detecção de danos genéticos em células individuais. Neste estudo foi usado tempo total de tratamento de 4 horas, devido ao fato de que no Ensaio do Cometa ser detectadas lesões primárias ao DNA antes que estas sejam reparadas. Segundo Tice et al. (2000) as culturas de células em suspensão ou monocamada devem ser expostas às substâncias testes pelo período de 3 a 6 horas.

Dessa forma, as concentrações 0,2, 0,5 e 1,0 μg/mL de urucum foram utilizadas para a avaliação de danos ao DNA pelo Ensaio do Cometa. Foi possível observar que as concentrações testadas não foram genotóxicas, não apresentando diferença significativa quando comparadas ao grupo controle. O valor da %DNA

encontrado no grupo controle de células PC12 estão de acordo com os valores encontrados por Colognato et al. (2006) que avaliaram o efeito protetor da ergotioneína (EGT) sobre a morte celular e os danos oxidativos provocados por H_2O_2 em células PC12. Nossos resultados corroboram os resultados encontrados por Agner et al. (2004) que avaliaram o efeito carcinogênico e anticarcinogênico do urucum em fígado de ratos Wistar, e observaram que o urucum não apresentou genotoxicidade na maior concentração testada (1000 ppm). É importante ressaltar que informações sobre os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do urucum *in vitro* são escassos na literatura, praticamente limitados a estudos *in vivo*.

Assim, podemos dizer que o urucum nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0 μg/mL não pode ser considerado um agente citotóxico e/ou genotóxico nas condições estudadas. No entanto, apresentou-se genotóxico em concentrações acima de 2,0 μg/mL.

No Ensaio do Cometa, a bixina apresentou valores do parâmetro %DNA inferiores ao do grupo controle em células PC12, mas apenas a concentração de 0,1 μg/mL apresentou diferença significativa. Resultados semelhantes, porém utilizando o antioxidante curcumina, foram encontrados por Park et al. (2008), que em células PC12 verificaram que o tratamento com o antioxidante apresentou diminuição dos danos quando comparado ao grupo controle.

Com base nos resultados encontrados, podemos afirmar que a bixina é citotóxica às células PC12 em concentrações superiores a 0,3 μg/mL, mas que nas concentrações analisadas no Teste do Micronúcleo e no Ensaio do Cometa não se apresentou citotóxica e/ou genotóxica.

Dessa forma, foi realizada a avaliação do efeito protetor do urucum e da bixina aos danos induzidos pela cisplatina em células PC12. Para isso, foi realizado

um pré-tratamento das células com as três concentrações de urucum e de bixina selecionadas anteriormente, 1 hora antes do tratamento com 0,10 μg/mL de cisplatina.

Como mostrado anteriormente, foi possível observar que a cisplatina, na concentração testada (0,1 μg/mL), foi mutagênica devido ao aumento da freqüência de micronúcleos e não apresentou citotoxicidade às células PC12. Por isso, essa concentração foi utilizada para induzir danos às células em todos os experimentos que tinham como objetivo verificar o efeito protetor do urucum e da bixina.

De uma maneira geral, na avaliação da viabilidade celular do pré-tratamento com urucum e com bixina, pode-se observar que a resposta foi dose-dependente, se comportando da mesma maneira do tratamento apenas com o urucum ou com a bixina. Portanto, estes resultados sugerem que não há efeito sinérgico na citotoxicidade do urucum ou da bixina com a concentração de cisplatina utilizada. Em contrapartida, alguns estudos sugerem que a cisplatina pode apresentar efeito sinérgico quando combinada com outras substâncias, como meloxican e JTE-522 (inibidor seletivo da COX-2) (NARUSE et al., 2007; MIZUTANI et al., 2004; SUGUIRA et al., 2003).

No Teste do Micronúcleo foi analisada a capacidade do urucum e da bixina em inibir a formação dos danos cromossômicos induzidos pelo tratamento com cisplatina.

Pode-se observar que as três concentrações de urucum testadas (0,2, 0,5 e 1,0 μg/mL) foram capazes de minimizar a mutagenicidade da cisplatina, inibindo de maneira significativa a indução de micronúcleos. Os valores encontrados apresentaram proteção entre 66% e 77% dos danos cromossômicos induzidos pela cisplatina, sendo que a concentração de 0,2 μg/mL foi a mais eficaz. No entanto,

Alves de Lima et al. (2003), em um estudo *in vivo* e utilizando tratamento simultâneo do urucum com o antitumoral ciclofosfamida, observaram que o urucum aumentou a frequência de micronúcleos em células de medula óssea de ratos, não conseguindo inibir as mutações induzidas pelo antitumoral.

Com relação ao pré-tratamento com bixina, pode-se observar que as três concentrações testadas também foram capazes de minimizar a mutagenicidade da cisplatina, diminuindo significativamente a freqüência de MN quando comparado ao tratamento somente com a cisplatina. A bixina apresentou entre 50% e 75% de proteção dos danos cromossômicos induzidos pelo antineoplásico, sendo a concentração de 0,1 μg/mL a mais eficaz. Nas condições aqui estudadas, pode-se dizer que a bixina foi antimutagênica, inibindo a formação de danos cromossômicos pela cisplatina. Da mesma forma, outros estudos mostraram que a bixina apresentou um efeito protetor contra a radiação e a clastogenicidade induzida pela cisplatina em ratos (THRESIAMMA, GEORGE, KUTTAN, 1998; SILVA, ANTUNES, BIANCHI, 2001). Estudos envolvendo os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos da bixina em células PC12 ainda não foram publicados.

O efeito protetor do urucum e da bixina sobre os danos primários ao DNA induzidos pela cisplatina nas células PC12 foi avaliado pela %DNA na cauda.

O tratamento com 0,1 μg/mL de cisplatina diminuiu o valor da %DNA na cauda quando comparado ao grupo controle negativo e aos grupos do pré-tratamento com urucum e com bixina. Em geral, para verificar os danos causados ao DNA pelo Ensaio do Cometa, analisamos a migração dos fragmentos de DNA na cauda dos nucleóides. Entretanto, vários estudos sugerem que essa migração pode ser inibida por ligações cruzadas intercadeias no DNA e facilitadas por ligações

intracadeias (PANG et al., 2007; WOZNIAK, CZECHOWSKA, BLASIAK, 2004; TICE et al., 2000; FAIRBAIRN, OLIVE, O´NEILL, 1995).

Assim, a existência de ligações cruzadas intercadeia promove a diminuição da mobilidade eletroforética do DNA, resultando em diminuição da "cauda" dos nucleóides, provocando redução dos valores encontrados nos parâmetros avaliados, como por exemplo, o "tail moment" (ALMEIDA et al., 2006).

Dessa forma, no presente estudo, podemos sugerir que a cisplatina gerou um número grande de ligações cruzadas intercadeias no DNA, como foi verificado pela diminuição da %DNA na cauda em relação ao grupo controle negativo. Assim, o efeito protetor do urucum e da bixina seria caracterizado pela diminuição da %DNA na cauda dos nucleóides dos grupos de pré-tratamento quando comparados ao grupo tratado apenas com cisplatina.

Embora tenha sido observado um efeito protetor do urucum aos danos cromossômicos induzidos pela cisplatina (Teste do Micronúcleo), esse efeito não pode ser confirmado pelos resultados do Ensaio do Cometa, já que não ocorreu uma diminuição da %DNA na cauda dos nucleóides do grupo de pré-tratamento com urucum quando comparados ao grupo cisplatina.

O pré-tratamento com a bixina apresentou %DNA inferior ao do grupo cisplatina. Apesar de não ter ocorrido diferença significativa entre os grupos de pré-tratamento com bixina e o grupo cisplatina, houve uma tendência da bixina em se apresentar como agente antigenotóxico, pois nas três concentrações testadas, a %DNA foi inferior ao grupo cisplatina, sendo que a concentração de 0,1 μg/mL apresentou a maior proteção.

Com base nos resultados obtidos, em concentrações superiores a 0,3 μg/mL, a bixina é citotóxica e pode provocar danos ao DNA de células PC12. No entanto,

em concentrações inferiores a 0,1 μg/mL pode ter se comportado como um antioxidante interceptando a geração de radicais livres pela cisplatina. O mecanismo de ação antioxidante *in vitro* pode envolver inibição direta da geração de espécies reativas de oxigênio ou o seqüestro de radicais livres (ARUOMA, 2003). Os carotenóides podem ser efetivos desativadores de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio, através de dois mecanismos: o primeiro, que consiste na associação direta com outra molécula formando compostos de degradação e o segundo através da desativação de espécies reativas, como o oxigênio singlete, $O_2(^1\Delta_g)$, pela transferência de energia sem prejuízos para a molécula de carotenóide que permanece com atividade antioxidante (RIOS, ANTUNES, BIANCHI, 2008).

Pang et al. (2007) relataram que o tratamento de células HCT116 com cisplatina por 3 horas resultou em uma redução relativa do parâmetro OTM em relação ao grupo controle negativo, sugerindo que um nível significativo de ligações intercadeias foi gerada pelo tratamento com cisplatina, como demonstrado pela diminuição da migração do DNA durante a eletroforese.

Wozniak, Czechowska, Blasiak (2004) verificaram que a cisplatina pode induzir fragmentação do DNA e ligações cruzadas ao DNA em linfócitos normais humanos e células tumorais K562 (leucemia mielógena crônica humana). Depois da incubação com cisplatina, também observaram nucleóides com caudas pequenas e com menos quantidade de DNA na cauda do que no controle e sugeriram que estes efeitos na versão alcalina do Ensaio do Cometa podem ser devidos a indução de ligações cruzadas e fragmentação do DNA pela cisplatina. Nadin et al. (2006) também verificaram redução na migração do DNA em linfócitos de sangue periférico (PBLs) tratados com cisplatina quando comparado com PBLs do grupo controle. Os resultados desses estudos sugerem que há uma significativa formação de ligações

cruzadas intercadeias no DNA quando é realizado o tratamento das células com cisplatina.

Houve uma tentativa de se fazer uma comparação entre os resultados do Teste do Micronúcleo e Ensaio do Cometa encontrados no grupo urucum e no grupo bixina. Para isso, levou-se em conta a porcentagem de bixina presente na amostra de urucum estudada, que foi de aproximadamente 7%. Dessa forma, nas concentrações de 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 μg/mL de urucum temos 0,015, 0,04, 0,08 e 0,15 μg/mL de bixina e, na análise comparativa dos resultados, podemos dizer que as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 μg/mL de urucum corresponde às concentrações de 0,05, 0,08 e 0,1 de bixina, respectivamente.

Vale ressaltar que no urucum, além da bixina, estão presentes vários outros compostos, como a norbixina, o β-caroteno, a criptoxantina, a luteína, a zeaxantina e a metilbixina (TIRIMANNA, 1981), e que estes compostos apresentam também propriedades antioxidantes.

Com relação à mutagenicidade do urucum e da bixina verificada pelo Teste do Micronúcleo, foi possível observar que os tratamentos apresentaram respostas semelhantes. Nos dois casos a resposta ao tratamento foi dose-dependente, com aumento da freqüência de micronúcleos aumentando-se a concentração testada. Já em relação à genotoxicidade avaliada pelo Ensaio do Cometa, o urucum e a bixina se comportaram de maneira diferente. O urucum teve um discreto aumento dos danos ao DNA com o aumento da concentração testada, enquanto a bixina apresentou diminuição destes danos, inclusive diferindo significativamente do grupo controle negativo na maior concentração analisada (0,1 μg/mL). Esse comportamento do urucum pode ser devido à presença de outros compostos, que podem atuar como pró-oxidante nas concentrações estudadas. Porém, vale ressaltar

que as concentrações de bixina superiores a 3,0 μg/mL foram citotóxicas às células PC12 e por isso, não foram analisadas pelos testes de genotoxicidade. Portanto, nas condições estudadas, verificamos que tanto o urucum quanto a bixina não foram mutagênicos ou genotóxicos às células PC12, porém mais estudos são necessários para a utilização de concentrações maiores, pois a bixina e o urucum podem ser citotóxicos e/ou genotóxicos.

Após os resultados obtidos acima, o urucum e a bixina foram avaliados quanto ao seu papel protetor dos danos induzidos pela cisplatina em células PC12.

Tanto o urucum quanto a bixina inibiram a formação de micronúcleos induzidos pela cisplatina. Porém, enquanto no pré-tratamento com urucum a freqüência de micronúcleos aumentou com o aumento da concentração testada (proteção de 76,7% na menor concentração para 66,4% na maior), no pré-tratamento com bixina a frequência de micronúcleos diminuiu (proteção de 50,8% na menor concentração para 74,6% na maior). Novamente poderia se atribuir estes resultados ao sinergismo dos compostos presentes no urucum, que em altas concentrações poderiam atuar como pró-oxidantes.

Podemos dizer que a mesma tendência ocorreu no Ensaio do Cometa, em que o pré-tratamento com urucum apresentou pequeno aumento nos danos com o aumento da concentração testada, e a bixina apresentou diminuição destes danos. Assim, observou-se que a bixina e o urucum apresentaram efeito dose-dependente.

Com base nos resultados encontrados, podemos afirmar que o urucum, em concentrações inferiores a 1,0 μg/mL não foi citotóxico e genotóxico às células PC12, mas, apesar de ser observada proteção aos danos cromossômicos, estes resultados não foram confirmados pelo Ensaio do Cometa, necessitando de mais estudos nessa área. Em relação à bixina podemos afirmar que, em concentrações

inferiores a 0,1 μg/mL, não foi citotóxica ou genotóxica às células PC12, possivelmente atuando como antioxidante ao interceptar a geração de radicais livres e proteger as células dos danos ao DNA induzidos pela cisplatina. Estes resultados podem ser confirmados por Rios, Antunes e Bianchi (2008) que utilizaram licopeno e bixina na concentração de 100 μM e demonstraram inibição da geração de espécies reativas de oxigênio induzidas pela interação DNA-cisplatina, de aproximadamente 42% e 44%, respectivamente. Sendo que a inibição da geração do ânion superóxido ($O^{\cdot-}_2$), correspondeu a 82 e 90%. O carotenóide licopeno foi estudado por Scolastici et al. (2008) que avaliaram sua ação protetora contra os danos genotóxicos e mutagênicos induzidos pela n-nitrosodietilamina e verificaram que o pré-tratamento de células HepG2 com licopeno inibiu os danos primários ao DNA e a formação de micronúcleos.

Dessa forma, os resultados do presente estudo indicam que o urucum e a bixina podem ser considerados agentes capazes de prevenir danos genotóxicos induzidos pela cisplatina *in vitro* e também poderia ajudar na modulação do estresse oxidativo encontrado na quimioterapia com este fármaco. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para melhor entender os mecanismos envolvidos na atividade protetora destes agentes.

Conclusão

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizadas análises preliminares para determinar o potencial citotóxico e genotóxico da cisplatina, do urucum e da bixina e posterior avaliação da bixina e do urucum como agentes protetores.

De acordo com os resultados aqui apresentados e discutidos, pode-se concluir que:

- A cisplatina na concentração de 0,1 µg/mL não apresentou citotoxicidade e foi genotóxica às células PC12;
- As concentrações de urucum e de bixina não citotóxicas às células PC12 foram 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL e 0,05, 0,08 e 0,10 µg/mL, respectivamente;
- As concentrações 2,0, 3,0 e 4,0 µg/mL de urucum induziram danos genotóxicos às células PC12; a bixina, nas concentrações analisadas, não foi capaz de induzir danos genotóxicos às células;
- O pré-tratamento com urucum nas concentrações 0,2, 0,5 e 1,0 µg/mL apresentou proteção entre 66,4% e 76,7% às células PC12 contra os danos cromossômicos induzidos pela cisplatina;
- O pré-tratamento com bixina nas concentrações 0,05, 0,08 e 0,10 µg/mL apresentou proteção entre 50,8% e 74,6% às células PC12 contra os danos cromossômicos induzidos pela cisplatina;
- A cisplatina não produz danos detectáveis pelo Ensaio do Cometa, devido à produção de ligações cruzadas que interferem na migração do DNA;

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SURRAH, A.S. Development and current status of unconventional platinum anticancer complexes. **Mini Rev. Med. Chem.**, v.7, n.2, p.203-211, 2007.

ABU-SURRAH, A.S.; KETTUNEN, M. Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. **Curr. Med. Chem.**, v. 13, p. 1337-1357, 2006.

AGARWAL, S.; RAO, A.V. Carotenoids and chronic diseases. **Drug Metab. Drug Interact.***,* v.17, n.1-4, p.189-210, 2000.

AGNER, A.R.; BARBISAN, L.F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food Chem. Toxicol.**, v.42, n.10, p.1687-1693, 2004.

ALBERTS, D.S.; NOEL, J.K. Cisplatin-associated neurotoxicity: can it be prevented? **Anticancer Drugs**, v.6, n.3, p.369-83, 1995.

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

ALVES DE LIMA, R.O.; AZEVEDO, L.; RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. **Food Chem. Toxicol.**, v.41, n.2, p.189-192, 2003.

ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Rev. Nutr.,** v.17, n.1, p.89-96, 2004.

ANTUNES, L.M.G.; PASCOAL, L.M.; BIANCHI, M.L.P.; DIAS, F.L. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.**, v.585, n.1-2, p.113-119, 2005.

APPENROTH, D.; FROB, S.; KERSTEN, L.; SPLINTER, F.K.; WINNEFELD, K. Protective effects of vitamin E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. **Arch. Toxicol.**, v.71, n.11, p.677-683, 1997.

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

ASTORG, P. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. **Trends Food Sci. Technol.***,* v.8, n.12, p.406-413, 1997.

ATBC (The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group). The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. **N. Engl. J. Med.**, v.330, p.1029-1035, 1994.

AUGE, P.; KOZELKA, J. Transformations and recognition of platinum-DNA adducts: recent developments. **Transition Met. Chem.**, v.22, p.91-96, 1997.

BAIK, M.H.; FRIESNER, R.A.; LIPPARD, S.J. Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? **J. Am. Chem. Soc.**, v.125, n.46, p.14082-14092, 2003.

BARNES, K.R.; LIPPARD, S.J. **Met. Ions Biol. Syst.**, v.42, p.143-177, 2004.

BEN AMMAR, R.; BOUHLEL, I.; VALENTI, K.; BEN SGHAIER, M.; KILANI, S.; MARIOTTE, A.M.; DIJOUX FRANCA, M.G.; LAPORTE, F.; GHEDIRA, G.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H2O2 and pre-treated with (Tunisian) Rhamnus alaternus extracts: combination with polyphenolic compounds and classic in vitro assays. **Chem. Biol. Interact.**, v.168, n.3, p.171-183, 2007.

BENIGNI, R.; ZITO, R. The second National Toxicology Program comparative exercise on the prediction of rodent carcinogenicity: definitive results. **Mutat. Res.**, v.566, n.1, p.49-63, 2004.

BERTRAM, J.S. Carotenoids and gene regulation. **Nutr. Rev.**, v.57, p.182-191, 1999.

BIANCHI, R.; BRINES, M.; LAURIA, G.; SAVINO, C.; GILARDINI, A.; NICOLINI, G.; RODRIGUEZ-MENENDEZ, V.; OGGIONI, N.; CANTA, A.; PENZA, P.; LOMBARDI, R.; MINOIA, C.; RONCHI, A.; CERAMI, A.; GHEZZI, P.; CAVALETTI, G. Protective effect of erythropoietin and its carbamylated derivative in experimental cisplatin peripheral neurotoxicity. **Clin. Cancer Res.**, v.12, n.8, p.2607-2612, 2006.

BOSE, R.N. Biomolecular targets for platinum antitumor drugs. **Mini Rev. Med. Chem.,** v.2, n.2, p.103-111, 2002.

BRAUNLICH, H.; APPENROTH, D.; FLECK, C. Protective effects of methimazole against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **J. Appl. Toxicol.**, v.17, n.1, p.41-45, 1997.

BROUWER, J.; VAN DE PUTTE, P.; FICHTINGER-SCHEPMAN, A.M.J.; REEDIJK, J. Base-pair substitution hotspots in GAG and GCG nucleotide sequences in Escherichia coli K-12 induced by cis-diamminedichloroplatinum (II). **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v.78, n.11, p.7010-7014, 1981.

CALOMME, M.; PIETERS, L.; VLIETINK, A.; BERGHE, D.V. Inhibition of bacterial mutagenesis by citrus flavonoids. **Planta Med.**, v.62, n.3, p.222–226, 1996.

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

CAVALETTI, G.; TREDICI, G.; MARMIROLI, P.; PETRUCCIOLI, M.G.; BARAJON, I.; FABBRICA, D. Morphometric study of the sensory neuron and peripheral nerve

changes induced by chronic cisplatin (DDP) administration in rats. **Acta Neuropathol.**, v.84, n.4, p.364-371, 1992.

CEPEDA, V.; FUERTES, M.A.; CASTILLA, J.; ALONSO, C.; QUEVEDO, C.; PEREZ, J.M. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Curr. Med. Chem. Anticancer Agents**, v.7, n.1, p.3-18, 2007.

CHIPITSYNA, G.; SLONINA, D.; SIDDIQUI, K.; PERUZZI, F.; SKORSKI, T.; REISS, K.; SAWAYA, B.E.; KHALILI, K.; AMINI, S. HIV-1 Tat increases cell survival in response to cisplatin by stimulating Rad51 gene expression. **Oncogene**, v.23, n.15, p.2664-2671, 2004.

CHO, J.-M.; MANANDHAR, S.; LEE, H.-R.; PARK, H.-M.; KWAK, M.-K. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. **Cancer Lett.**, v.260, n.1-2, p.96-108, 2008.

COLLINS, A.R. Carotenoids and genomic stability. **Mutat. Res.**, v.475, n.1-2, p.21-28, 2001.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol. Biotechnol.**, v.26, n.3, p.249-261, 2004.

COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies—reliability, validation and applications. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.30, n.2, p.139-146, 1997.

COLOGNATO, R.; LAURENZA, I.; FONTANA, I.; COPPEDÉ, F.; SICILIANO, G.; COECKE, S.; ARUOMA, O.I.; BENZI, L.; MIGLIORE, L. Modulation of hydrogen peroxide-induced DNA damage, MAPKs activation and cell death in PC12 by ergothioneine. **Clin. Nutr.**, v.25, n.1, p.135-145, 2006.

CONTRERAS, P.C.; VAUGHT, J.L.; GRUNER, J.A.; BROSNAN, C.; STEFFLER, C.; AREZZO, J.C.; LEWIS, M.E.; KESSLER, J.A.; APFEL, S.C. Insulin-like growth factor-I prevents development of a vincristine neuropathy in mice. **Brain Res.**, v.774, n.1-2, p.20-26, 1997.

COOLEY, M.E.; DAVIS, L.E.; DESTEFANO, M.; ABRAHM, J. Cisplatin: a clinical review. Part I - current uses of cisplatin and administration guidelines. **Cancer Nurs.**, v.17, n.3, p.173-84, 1994.

DAVIS, I.D.; KIERS, L.; MACGREGOR, L.; QUINN, M.; AREZZO, J.; GREEN, M.; ROSENTHAL, M.; CHIA, M.; MICHAEL, M.; BARTLEY, P.; HARRISON, L.; DALY, M. A randomized, double-blinded, placebo-controlled phase II trial of recombinant human leukemia inhibitory factor (rhuLIF, emfilermin, AM424) to prevent chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Clin. Cancer Res.**, v.11, n.5, p.1890-1898, 2005.

DE FLORA, S.; BRONZETTI, G.; SOBELS, F.H. Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. **Mutat. Res.,** v.267, n.2, p.153-155, 1992.

DE OLIVEIRA, A.R.; MACHADO-SANTELLI, G.M. Diphenylhydantion and mitotic spindle abnormalities in culture mouse and human cells. **Mutat. Res.**, v.187, n.2, p.91-97, 1987.

DI MASCIO, P.; DEVASAGAYAM, T.P.; SIES, H. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. **Biochem. Soc. Trans.**, v.18, p.1054-1056, 1990.

DIMANCHE-BOITREL, M.T.; MEURETTE, O.; REBILLARD, A.; LACOUR, S. Role of early plasma membrane events in chemotherapy-induced cell death. Drug Resist. Updat., v.8, p.5-14, 2005.

DONZELLI, E.; CARFI, M.; MILOSO, M.; STRADA, A.; GALBIATI, S.; BAYSSAS, M.; GRIFFON-ETIENNE, G.; CAVALETTI, G.; PETRUCCIOLI, M.G.; TREDICI, G. Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblestoma cell line SH-SY5Y. **J. Neurooncol.**, v.67, n.1-2, p.65-73, 2004.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, n.3, p.191-205, 2008.

EASTMAN, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. **Pharmacol. Ther.**, v.34, n.2, p.155-66, 1987.

ELLIOTT, R. Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1740, n.2, p.147-154, 2005.

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

EVANS, H.J. Mutation cytogenetics: past, present and future. **Mutat. Res.**, v.204, n.3, p.355-363, 1988.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O´NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v.339, n.1, p.37-59, 1995.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v.455, n.1-2, p.81-95, 2000.

FENECH, M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). **Food Chem. Toxicol.**, v.40, n.8, p.1113-1117, 2002.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human Micronucleus project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res.**, v.428, n.1-2, p.271-283, 1999.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat Res,** v.392, n.1-2, p.11-18, 1997.

FERNANDES, A.C.S.; ALMEIDA, C.A.; ALBANO, F.; LARANJA, G.A.T.; FELZENSZWALB, I.; LAGE, C.L.S.; DE SÁ, C.C.N.F.; MOURA, A.S.; KOVARY, K. Norbixin ingestion did not induce any detectable DNA breakage in liver and kidney but caused a considerable impairment in plasma glucose levels of rats and mice. **J. Nutr. Biochem.**, v.13, n.7, p. 411-420, 2002.

FICHTINGER-SCHEPMAN, A.M.J.; VAN DER VEER, J.L.; DEN HARTOG, J.H.J.; LOHMAN, P.H.M.; REEDIJK, J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: formation, identification, and quantitation. **Biochemistry**, v.24, n.3, p.707-713, 1985.

FRAGA, C.G.; ARIAS, R.F.; LLESUY, S.F.; KOCH, O.R.; BOVERIS, A. Effect of vitamin E and selenium-deficiency on rat liver chemiluminescence. **Biochem. J.**, v.242, n.2, p.383–386, 1987.

FRAM, R.J. Cisplatin and platinum analogues: recent advances. **Curr. Opin. Oncol.**, v.4, n.6, p.1073-1079, 1992.

FRANCESCATO, H.D.C.; COIMBRA, T.M.; COSTA, R.S.; BIANCHI, M.L.P. Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. **Kidney Blood Press. Res.**, v.27, n.3, p.148-158, 2004.

FRIEDMANN, B.; CAPLIN, M.; HARTLEY, J.A.; HOCHHAUSER, D. Modulation of DNA repair in vitro after treatment with chemotherapeutic agents by the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib (ZD1839). **Clin. Cancer Res.**, v.10, n.19, p.6476-6486, 2004.

GARTLON, J.; KINSNER, A.; BAL-PRICE, A.; COECKE, S.; CLOTHIER, R.H. Evaluation of a proposed *in vitro* test strategy using neuronal and non-neuronal cell systems for detecting neurotoxicity. **Toxicol. In Vitro**, v.20, n.8, p.1569-1581, 2006.

GATELY, D.P.; HOWELL, S.B. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. **Br. J. Cancer**, v.67, n.6, p.1171-1176, 1993.

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

GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P.M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends Biotechnol.**, v.21, n.12, p.513-516, 2003.

GOLDEN, J.P.; JOHNSON JR, E.M. Models of chemotherapy drug-induced peripheral neuropathy. **Drug Discov. Today Dis. Models**, v.1, n.2, p.186-191, 2004.

GONZALEZ, V.M.; FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; PEREZ, J.M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Mol. Pharmacol.**, v.59, n.4, p.657-663, 2001.

GRACY, R.W.; TALENT, J.M.; KONG, Y.; CONRAD, C.C. Reactive oxygen species the unavoidable environmental insult. **Mutat. Res.**, v.428, n.1-2, p.17–22, 1999.

GREENE, L.A.; TISCHLER, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v.73, n.7, p.2424-2428, 1976.

GREGG, R.W.; MOLEPO, J.M.; MONPETIT, V.J.; MIKAEL, N.Z.; REDMOND, D.; GADIA, M.; STEWART, D.J. Cisplatin Neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurological tissue and morphological evidence of toxicity. **J. Clin. Oncol.**, v.10, n.5, p.795-803, 1992.

GUMINSKI, A.D.; HARNETT, P.R.; DEFAZIO, A. Scientists and clinicians test their metal-back to the future with platinum compounds. **Lancet Oncol.**, v.3, n.5, p.312-318, 2002.

HARTMANN, J.T.; LIPP, H.P. Toxicity of platinum compounds. **Expert Opin. Pharmacother.**, v.4, n.6, p.889-901, 2003.

HAVELAND-SMITH, R.B. Evaluation of the genotoxicity of some natural food colours using bacterial assays. **Mutat. Res.**, v.91, n.4-5, p.285-290, 1981.

HAYAKAWA, K.; ITOH, T.; NIWA, H.; MUTOH, T.; SOBUE, G. NGF prevention of neurotoxicity induced by cisplatin, vincristine and taxol depends on toxicity of each drug and NGF treatment schedule: in vitro study of adult rat sympathetic ganglion explants. **Brain Res.**, v.794, n.2, p.313-319, 1998.

HAYDER, N.; SKANDRANI, I.; KILANI, S.; BOUHLEL, I.; ABDELWAHED, A.; BEN AMMAR, R.; MAHMOUD, A.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Antimutagenic activity of Myrtus communis L. using the Salmonella microsome assay. **S. Afr. J. Bot.**, v.74, n.1, p.121-125, 2008.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWEL, G.W.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: a report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutat. Res**., v.123, n.1, p.61-118, 1983.

HIGBY, D.J.; WALLACE JR, H.J.; ALBERT, D.J.; HOLLAND, J.F. Diaminodichloroplatinum: A phase I study showing responses in testicular and other tumors. **Cancer***,* v.33, n.5, p.1219-12258, 1974.

HO, Y.P.; AU-YEUNG, S.C.F.; TO, K.K.W. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. **Med. Res. Rev.**, v.23, n.5, p.633-655, 2003.

HUANG, H.; ZHU, L.; REID, B.R.; DROBNY, G.P.; HOPKINS, P.B. Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link. **Science**, v.270, n.5243, p.1842-1845, 1995.

ISHIDATE, M.; SOFUNI, K.; YOSHIKAWA, K.; HAYASHI, M.; NOHMI, M.; SAWADA, M.; MATSUOKA, A. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. **Food Chem. Toxicol.**, v.22, n.8, p.623-636, 1984.

JACKSON, S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. **Carcinogenesis**, v.23, n.5, p.687-696, 2002.

JAMIESON, E.R.; LIPPARD, S.J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. **Chem. Rev**., v.99, n.9, p.2467-2498, 1999.

JEWELL, C.; O'BRIEN, N.M. Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. **Br. J. Nutr.***,* v.81, n.3, p.235-242, 1999.

JIRSOVA, K.; MANDYS, V.; GISPEN, W.H.; BAR, P.R. Cisplatin-induced apoptosis in cultures of human Schwann cells. **Neurosci. Lett.**, v.392, n.1-2, p.22-26, 2006.

JOHNSON, E.J. The role of carotenoids in human health. **Nutr. Clin. Care**, v.5, n.2, p.56-65, 2002.

KASSIE, F.; PARZEFALL, W.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. **Mutat. Res.**, v.463, n.1, p.13-31, 2000.

KARRER, P.; JUCKER, E. **Carotenoids**. Elsevier Publishing Company Inc., 384 p., 1950.

KAYANE, M.A.; PARRY, J.M. The detection and assessment of the aneugenic potential of selected oestrogens, progestins and androgens using the *in vitro* cytokinesis blocked micronucleus assay. **Mutat. Res.**, v.651, n.1-2, p.40-45, 2008.

KLEIN, R.; BROWN, D.; TURNLEY, A.M. Phenoxodiol protects against Cisplatin induced neurite toxicity in a PC12 cell model. **BMC Neurosci.**, v.8, n.61, p.1-7, 2007.

KOBERLE, B.; GRIMALDI, K.A.; SUNTERS, A.; HARTLEY, J.A.; KELLAND, L.R.; MASTERS, J.R.W. DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. **Int. J. Cancer**, v.70, n.5, p.551-555, 1997.

KONG, Q.; LILLEHEI, K.O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Med. Hypotheses,** v.51, n.5, p.405-409, 1998.

KOSMIDER, B.; WYSZYNSKA, K.; JANIK-SPIECHOWICZ, E.; OSIECKA, R.; ZYNER, E.; OCHOCKI, J.; CIESIELSKA, E.; WASOWICZ, W. Evaluation of the genotoxicity of cis-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) in comparison with cis-DDP. **Mutat. Res.**, v.558, n.1-2, p.93-110, 2004.

KRARUP-HANSEN, A.; RIETZ, B.; KRARUP, C. Histology and platinum content of sensory ganglia and sural nerves in patients treated with cisplatin and carboplatin: An autopsy study. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v.25, n.1, p.28-39, 1999.

KRUSZEWSKI, M.; WOJEWODZKA, M.; IWANENKO, T.; COLLINS, A.R.; SZUMIEL, I. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation: II. Base damage. **Mutat. Res.**, v.416, n.1-2, p.37-57, 1998.

LAMSON, D.W.; BRIGNALL, M.S. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. **Altern. Med. Rev**., v.4, n.5, p.304-329, 1999.

LE FEVRE, A.C.; BOITIER, E.; MARCHANDEAU, J.P.; SARASIN, A.; THYBAUD, V. Characterization of DNA reactive and non-DNA reactive anticancer drugs by gene expression profiling. **Mutat. Res.**, v.619, n. 1-2, p.16-29, 2007.

LEONETTI, C.; BIROCCIO, A.; GABELLINI, C.; SCARSELLA, M.; MARESCA, V.; FLORI, E.; BOVE, L.; PACE, A.; STOPPACCIARO, A.; ZUPI, G.; COGNETTI, F.; PICARDO, M. Alpha-tocopherol protects against cisplatin-induced toxicity without interfering with antitumor efficacy. **Int. J. Cancer**, v.104, n.2, p.243-250, 2003.

LIPPERT, B. Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Wiley, Weinheim, Germany, 1999.

LIU, H.; BALIGA, R. Effect of iron chelator, hydroxyl radical scavenger and cytochrome P450 inhibitors on the cytotoxicity of cisplatin to tumor cells. **Anticancer Res.**, v.20, p.4547-4550, 2000.

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

LIU, X.; PISHA, E.; TONETTI, D.A.; YAO, D.; LI, Y.; YAO, J.; BURDETTE, J.E.; BOLTON, J.L. Antiestrogenic and DNA damaging effects induced by tamoxifen and toremifene metabolites. **Chem. Res. Toxicol.**, v.16, n.7, p.832-837, 2003.

LLOYD, R.; KELLAND, L. Cisplatin-based anticancer agent. Uses of inorganic chemistry in medicine. Farrell, N. Cambridge, **Royal Society of Chemistry**, p.109-134, 1999.

MALECKI, E.A. Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. **Brain Res. Bull.**, v.55, n.2, p.225-228, 2001.

MALUF, S.W.; PASSOS, D.F.; BACELAR, A.; SPEIT, G.; ERDTMANN, B. Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to x-radiation using the micronucleus test and the comet assay. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.38, n.4, p.311-315, 2001.

MARKMAN, M. Toxicities of the platinum antineoplastic agents. **Expert Opin. Drug Saf.**, v.2, n.6, p.597-607, 2003.

MARZANO, C.; BETTIO, F.; BACCICHETTI, F.; TREVISAN, A.; GIOVAGNINI, L.; FREGONA, D. Antitumor activity of a new platinum(II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity. **Chem. Biol. Interact.**, v.148, n.1-2, p.37-48, 2004.

MASUDA, H.; TANAKA, T.; TAKAHAMA, U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.203, n.2, p.1175-1180, 1994.

MATOS, H.R.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.383, n.1, p.56-59, 2000.

MAXWELL, S.R.J. Prospects for the use antioxidant therapies. **Drugs**, v.49, p.345-361, 1995.

MCCARRON, M.O.; RUSSEL, A.J.; METCALFE, R.A.; DEYSILVA, R. Chronic vitamin E deficiency causing spinocerebellar degeneration, peripheral neuropathy, and centro-cecal scotomata. **Nutrition**, v.15, n.3, p.217-219, 1999.

MCDONALD, S.R.; SOHAL, R.S.; FORSTER, M.J. Concurrent administration of coenzyme Q10 and ∝-tocopherol improves learning in aged mice. **Free Radic. Biol. Med.**, v.38, n.6, p.729-736, 2005a.

MCDONALD, E.S.; RANDON, K.R.; KNIGHT, A.; WINDEBANK, A.J. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. **Neurobiol. Dis.**, v.18, n.2, p.305- 313, 2005b.

MCKELVEY-MARTIN, V.; GREEN, M., SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B.; DE MEO, M.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review. **Mutat. Res.**, v.288, n.1, p.47–63, 1993.

MCKENNA, D.J.; GALLUS, M.; MCKEOWN, S.R.; DOWNES, C.S.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. Modification of the alkaline comet assay to allow simultaneous evaluation of mitomycin C-induced DNA cross-link damage and repair of specific DNA sequences in RT4 cells. **DNA Repair**, v.2, n.8, p.879-890, 2003.

MCKENNA, D.J.; MCKEOWN, S.R.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.183-190, 2008.

MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Three Minor Carotenoids from Annatto (*Bixa orellana)* seeds. **Phytochemistry**, v.52, n.1, p.135-139, 1999.

MILLER, S.E.; HOUSE, D.A. The hydrolysis products of cis-diamminedichloroplatinum (II). The anation kinetics of cis-Pt(X)(NH3)2(OH2)+ (X=Cl, OH) with glycine, monohydrogen malonate and chloride. **Inorganica Chim. Acta**, v.187, n.2, p.125-132, 1991.

MIYAMAE, Y.; IWASAKI, K.; KINAE, N.; TSUDA, S.; MURAKAMI, M.; TANAKA, M.; SASAKI, Y. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. Relationship between DNA migration and alkaline condition. **Mutat. Res.**, v.393, n. 1-2, p.107-113, 1997.

MIYAMAE, Y.; ZAIZEN, K.; OHARA, K.; MINE, Y.; SASAKI, Y. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (comet) assay: relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. **Mutat. Res.**, v.415, n.3, p.229-235, 1998.

MIZUTANI Y.; NAKANISHI, H.; LI, Y.N.; SATO, N.; KAWAUCHI, A.; MIKI, T. Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to cisplatin mediated cytotoxicity and apoptosis in vitro and in vivo by the selective cyclooxygenase-2 inhibitor JTE-522. **Urology,** v.172, p.1474-1479, 2004.

MONTENEGRO, M.A.; RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A.Z.; NAZARENO, M.A.; BORSARELLI, C.D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.2, p.367-373, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MURE, K.; ROSSMAN, T.G. Reduction of spontaneous mutagenesis in mismatch repair-deficient and proficient cells by dietary antioxidants. **Mutat. Res.**, v.480-481, p.85-95, 2001.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; DRAGO, G.; IBARRA, J.; CIOCCA, D.R. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from health individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Lett.**, v.239, n.1, p.84-97, 2006.

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

NEFIC, H. Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.**, v.498, n.1-2, p.89-98, 2001.

NESSLANY, F.; ZENNOUCHE, N.; SIMAR-MEINTI´ERES, S.; TALAHARI, I.; NKILI-MBOUI, E.N.; MARZIN, D. *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutat. Res.**, v.630, n.1-2, p.28-41, 2007.

NISHIKAWA, M.; NAGATOMI, H.; NISHIJIMA, M.; OHIRA, G.; CHANG, B.J.; SATO, E.; INOUE, M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits nephrotoxicity of cisplatin and increases the survival of cancer-bearing mice. **Cancer Lett.**, v.171, n.2, p.133-138, 2001.

NITISS, J.L. A copper connection to the uptake of platinum anticancer drugs. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.99, n.22, p.13963-13965, 2002.

OHMICHI, M.; HAYAKAWA, J.; TASAKA, K.; KURACHI, H.; MURATA, Y. Mechanisms of platinum drug resistance. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.26, n.3, p.113-116, 2005.

OMENN, G.S.; COODMAN, G.; THORNQUIST, M.; GRIZZLE, J.; ROSENSTOCK, L.; BARNHART, S.; BALMES, J.; CHERNIACK, M.G.; CULLEN, M.R.; GLASS, A. The ß-carotene and retinol efficacy trial (CARET) for chemoprevention of lung cancer in high risk populations: smokers and asbestos-exposed workers. **Cancer Res.**, v.54 (7 suppl), p.2938s-2043s, 1994.

ORHAN, B.; YALCIN, S.; NURLU, G.; ZEYBEK, D.; MUFTUOGLU, S. Erythropoietin against cisplatin-induced peripheral neurotoxicity in rats. **Med. Oncol.**, v.21, n.2, p.197-203, 2004.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.123, n.1, p.291-298, 1984.

ÖZTURK, G.; ERDOGAN, E.; ANLAR, O.; KOSEM, M.; TASPINAR, M. Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice. **Cytokine,** v.29, n.1, p.31-41, 2005.

OZTURK, O.H.; BOZCUK, H.; BURGUCU, D.; EKINCI, D.; OZDOGAN, M.; AKCA, S.; YILDIZ, M. Cisplatin cytotoxicity is enhanced with zoledronic acid in A549 lung cancer cell line: Preliminary results of an in vitro study. **Cell Biol. Int.,** v.31, n.9, p.1069-1071, 2007.

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

PAIVA, S.A.R.; RUSSELL, R.M. B-carotene and other carotenoids as antioxidants. **J. Am. Coll. Nutr.***,* v.18, n.5, p.426–433, 1999.

PANG, S.-K., YU, C.-W., AU-YEUNG, S.C.F., HO, Y.-P. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.363, n.1, p.235-240, 2007.

PARK, S.Y.; KIM, H.S.; CHO, E.K.; KWON, B.Y.; PHARK, S.; HWANG, K.W.; SUL, D. Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. **Food Chem. Toxicol.**, v.46, n.8, p.2881-2887, 2008.

PEREZ, R.P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. **Eur. J. Cancer**, v.34, n.10, p.1535-1542, 1998.

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

PISANO, C.; PRATESI, G.; LACCABUE, D.; ZUNINO, F.; GIUDICE, P.; BELLUCCI, A.; PACIFICI, L.; CAMERINI, B.; VESCI, L.; CASTORINA, M.; CICUZZA, S.; TREDICI, G.; MARMIROLI, P.; NICOLINI, G.; GALBIATI, S.; CALVANI, M.; CARMINATI, P.; CAVALETTI, G. Paclitaxel and Cisplatin-Induced Neurotoxicity: A Protective Role of Acetyl-L-Carnitine. **Clin. Cancer Res.**, v.9, n.15, p.5756-5767, 2003.

POPOFF, S.; BECK, D.J.; RUPP, W.D. Repair of plasmid DNA damaged in vitro with cis- or trans-diamminedichloroplatinum(II) in *Escherichia coli*. **Mutat. Res.**, v.183, n.2, p.129-137, 1987.

PRESTON, R.J. Epigenetic processes and cancer risk assessment. **Mutat. Res.**, v.616, n.1-2, p.7-10, 2007.

PRESTON, H.D.; RICKARD, M.D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chem.**, v.5, n.1, p.47-56, 1980.

PUNG, A.; FRANKE, A.; ZHANG, L.X.; IPPENDORF, H.; MARTIN, H.D.; SIES, H.; BERTRAM, J.S. A synthetic C22 carotenoid inhibits carcinogen-induced neoplastic transformation and enhances gap junctional communication. **Carcinogenesis**, v.14, n.5, p.1001-1005, 1993.

QUASTHOFF, S.; HARTUNG, H.P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **J. Neurol.**, v.249, n.1, p.9-17, 2002.

RABIK, C.A.; DOLAN, M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treat. Rev.**, v.33, n.1, p.9-23, 2007.

RAJSKI, S.R.; WILLIAMS, R.M. DNA cross-linking agents as antitumor drugs. **Chem. Rev.**, v.98, n.8, p.2723-2795, 1998.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. Ulbra, 356p., 2003.

RICHTER, C.; PARK, J.W.; AMES, B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.85, n.17, p.6465–6467, 1988.

RIOS, A. de O.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin-DNA interaction. **Food Chem.**, (2008), doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.084

RIOS, A. de O.; BORSARELLI, C.D.; MERCADANTE, A.Z. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.6, p.2307-2311, 2005.

RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A.Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em snacks extrusados por CLAE. **Alim. Nutr.**, v.3, n.15, p.203-213, 2004.

RODILLA, V.; PELLICER, J.A.; PERTUSA, J.; MOTHERSILL, C. Induction of micronucleated and binucleate cells in Chinese hamster ovary (CHO) cells by cis-diamminedichloroplatinum (II): a morphological and morphometric study. **Mutat. Res.**, v.241, n.2, p.115-124, 1990.

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

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L. The Successful Regression of Large Solid Sarcoma Tumors by Platinum Compounds. **Cancer Res.**, v.30, n.6, p.1799-1802, 1970.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v.205, n.4972, p.698-699, 1965.

ROSENBERG B.; VANCAMP L.; TROSKO J.E.; MANSOUR V.H. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. **Nature**, v.222, n.5191, p.385, 1969.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; OLIVEIRA, M.D.M.; PEREIRA, C.A.B.; BEÇAK, W. The protective effect of beta-carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutat. Res.**, v.265, n.2, p.237-244, 1992.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; NATARAJAN, A.T. Effect of beta-carotene on clastogenic effects of mitomycin C, methyl methanesulfonate and bleomycin in CHO cells. **Mutagenesis**, v.9, n.1, p. 53-57, 1994.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; PEÑARROJA-FLORES, R.; TOLEDO-GARCÍA, J.; BRAVO, J.L.; CASTILLO, E.R.; BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutat. Res.**, v.640, n.1-2, p.8-15, 2008.

SANTOS, G.C.; MENDONÇA, L.M.; ANTONUCCI-PASSOS, G.A.; ANTUNES, L.M.G.; SANTOS, A.C.; BIANCHI, M.L.P. Efeitos do extrato de urucum sobre a citotoxicidade e genotoxicidade da cisplatina em células PC12. **Rev. Bras. Toxicol.**, v.20, n.2, p.108, 2007.

SCOLASTICI, C.; ALVES DE LIMA, R.O.; BARBISAN, L.F.; FERREIRA, A.L.A.; RIBEIRO, D.A.; SALVADORI, D.M.F. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicol. In Vitro**, v.22, n.2, p.510-514, 2008.

SCOTTER, M.J.; APLLETON G.P.; CASTLE L. Kinetic and Yield for the Formation of Coloured and Aromatic Thermal Degradation Products of Annatto in Foods. **Food Chemistry**, v.74, n.3, p.365-375, 2001.

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

SHEIKH-HAMAD, D. Cisplatin-induced citoxicity: is the nucleus relevant? **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v.295, n.1, p.F42-F43, 2008.

SIDDIK, Z.H. Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: DNA-interactive alkylating agents and antitumour platinum-based drugs. **The Cancer Handbook**. Alison, M. R. London, Nature Publishing Group: p.1295-1313, 2002.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.62, n.6, p.1315S-1321S, 1995.

SILVA, C.R.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacol. Res.**, v.43, n.6, p.561-566, 2001.

SINGH, M.; KAUR, P.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. **Mutat. Res.**, v.654, n.2, p.145-149, 2008.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res**., v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SUGGITT, M.; FEARNLEY, J.; SWAINE, D.J.; VOLPATO, M.; PHILLIPS, R.M.; BIBBY, M.C.; LOADMAN, P.M.; ANDERSON, D. Comet assay and flow cytometry analysis of DNA repair in normal and cancer cells treated with known mutagens with different mechanisms of action. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, v.23, n.S2, p.13-29, 2003.

SUGIHARA, K.; GEMBA, M. Modification of cisplatin toxicity by antioxidants. **J. Pharmacol.**, v.40, n.2, p.353-355, 1986.

SUGIMURA, T. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. **Science**, v.258, n.5082, p.603-607, 1992.

SUGIURA, T.; SAIKAWA, Y.; KUBOTA, T.; SUGANUMA, K.; OTANI, Y.; WATANABE, M. et al. Combination chemotherapy with JTE-522, a novel selective Cyclooxygenase-2 inhibitor, and cisplatin against gastric cancer cell lines in vitro and in vivo. **In Vivo**, v.17, p.229-234, 2003.

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

TAKAHARA, P.M.; ROSENZWEIG, A.C.; FREDERICK, C.A.; LIPPARD, S.J. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. **Nature**, v.377, n.6550, p.649-652, 1995.

THRESIAMMA, K.C.; GEORGE, J.; KUTTAN, R. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v.17, p.431-434, 1998.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHY, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.35, n.3, p.206-221, 2000.

TIRIMANNA, A.S.L. Study of the carotenoid pigments of *Bixa orellana* L. seeds by thin layer chromatography. **Mikrochim. Acta**, v.76, n.1-2, p.11-16, 1981.

TRIMMER, E.E.; ESSIGMANN, J.M. Cisplatin. **Essays Biochem.**, v.34, p.191-211, 1999.

TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutat. Res.**, v.365, n.1-3, p.147-159, 1996.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.4, n.4, p.307-320, 2005.

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

WEIJL, N.I.; WIPKINK-BAKKER, A.; LENTJES, E.G.W.M.; BERGER, H.M.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. **Ann. Oncol.**, v.9, n.12, p.1331-1337, 1998.

WEISS, R.B.; CHRISTIAN, M.C. New cisplatin analogues in development. A review. **Drugs,** v.46, n.3, p.360-77, 1993.

WENIGER, B.; JIANG, Y.; OULAD-ALI, A.; ITALIANO, L.; BECK, J.P.; ANTON, R. Biological effects of bixin and bixa orellana extracts on lymphoid cells in culture. **Planta Med.**, v.59, S-1, p.A680, 1993.

WOJEWODZKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; IWANENKO, T.; COLLINS, A.R.; SZUMIEL, I. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation: I. Strand breakage**. Mutat. Res.**, v.416, n.1-2, p.21-35, 1998.

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

WOZNIAK, K.; KOLACINSKA, A.; BLASINSKA-MORAWIEC, M.; MORAWIEC-BAJDA, A.; MORAWIEC, Z.; ZADROZNY, M.; BLASIAK, J. The DNA damaging potential of tamoxifen in breast cancer and normal cells. **Arch. Toxicol.**, v.81, n.7, p.519-527, 2007.

YAGI, A.; KABASH, A.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; MOUSTAFA, S.M.; KHALIFA, T.I. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in Aloe vera. **Planta Med.**, v.68, n.11, p.957-960, 2002.

YAMAUCHI, T.; KAWAI, Y.; UEDA, T. Enhanced DNA excision repair in CCRF-CEM cells resistant to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, quantitated using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. **Biochem. Pharmacol.**, v.66, n.6, p.939-946, 2003.

ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? **Mutat. Res.**, v.626, n.1-2, p.1-3, 2007.

ZHANG, J.; LIU, L.; GONG, Y.; ZHENG, X.; YANG, M.; CUI, J.; SHEN, S. Synthesis, characterization and antitumor activity of new type binuclear platinum (II) complexes. **Eur. J. Med. Chem.**, xx, p.1-6, 2008.

ZHANG, L.X.; COONEY, R.V.; BERTRAM, J.S. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. **Carcinogenesis**, v.12, n.11, p.2109-2114, 1991.

ZHAO, W.; HAN, Y.; ZHAO, B.; HIROTA, S.; HOU, J.; XIN, W. Effect of carotenoids on the respiratory burst of rat peritoneal macrophages. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1381, n.1, p.77-88, 1998.

ZOLI, W.; RICOTTI, L.; TESEI, A.; ULIVI, P.; GASPERI CAMPANI, A.; FABBRI, F.; GUNELLI, R.; FRASSINETI, G.L.; AMADORI, D. Schedule-dependent cytotoxic interaction between epidoxorubicin and gemcitabine in human bladder cancer cells in vitro. **Clin. Cancer Res.**, v.10, n.4, p.1500-1507, 2004.

Anexos

Anexo 1

CORANTEC®
CORANTES NATURAIS LTDA.

P. A 3 COLORÍFICO
REG MS No 5.9178.0008.001-8

COMPOSIÇÃO E FABRICAÇÃO

"P. A 3 COLORÍFICO " Um preparado em pó composto por carotenóides vegetais e condimentos colorífico que confere aos alimentos uma pigmentação estritamente natural tornando-as desta forma , mais atraentes e saudáveis.
O processo de fabricação do "P. A 3 COLORÍFICO ",envolve uma rigorosa seleção de matérias primas e técnicas recentemente desenvolvidas que possibilita a preservação de todas as propriedades das semente de urucum , potencializando desta forma seus efeitos tintoriais e fixação .
O produto é esterilizado por irradiação de raios gama , método mais segura e eficiente, reduzindo riscos de contaminação sem que ocorra danos a saúde, aprovado pela Organização Mundial do Comércio e pelo Codex Alimentarius.

P. A 3 COLORÍFICO CONTÉM

Biixina (urucum) , e farinha de milho.

APLICAÇÃO

Produto Indicado Para : panificação , snacks, biscoitos, sopas e rações.

EMBALAGEM E RÓTULO

Embalagem	Caixa de 10 Kg com 4 embalagens de polietileno atóxico de 2,5 kg cada
Rótulo	Contém Colorífico ou corante natural de urucum

ASPECTO FÍSICO QUÍMICO

Aspecto	Pó fino
Cor	Alaranjado
Sabor	Característico.
Massa Específica	0,60 ± 0,05
Umidade (%)	9,0 ± 1,0

PARA OBTENÇÃO DA COR AMARELA OU ALARANJADO

SISTEMA PRÉ - MIX:
Adicionar 10 kg de "P. A 3 COLORÍFICO " em 90 kg de farinha e agitar em misturador próprio, adicionar de 1.5 a 3.5 kg desta mistura por saco de 50 Kg de produto.

SISTEMA DIRETO:
Adicionar de 150 a 350 gr. de "P. A 3 CLORÍFICO". para cada saco de 50 Kg de farinha ou equivalente diretamente no misturador ,ou em água de processo com agiitação.

– ***Certificamos que o P. A 3 Colorífico não possui componentes trangênicos ..***

PROTEGER DA LUZ, CALOR E UMIDADE / VALIDADE 1 ANO.

RUA JAVAÉS, 166 - BOM RETIRO - SÃO PAULO - SP - TRONCO CHAVE: (11) 3224-0078 - CEP 01130-010
Site: www.corantec.com.br E-mails: atendimento@corantec.com.br - vendas@corantec.com.br

Anexo 2

Determinação por HPLC da porcentagem de bixina presente na amostra de urucum

As condições empregadas para a análise do extrato de urucum estão apresentadas abaixo.

Coluna	*ODS Analítica - Spherisorb 4,6x250mmx5 µm*
Temperatura da Coluna	*Temperatura ambiente (25ºC)*
Detector	*D.A.D. Shimadzu Modelo SPD - M10AVP*
Fase Móvel	*MeOH 80% - H_2O 10% - Acetato de Etila 10%*
Fluxo da Fase Móvel	*1 mL/min*
Programação do Gradiente	*Isocrático*
Volume da Amostra	*20 µL*
Bomba	*Shimadzu LC-6AD*
Comprimento de Onda	*190 - 800 nm*
Tempo de Análise	*20 minutos*

O melhor comprimento de onda para análise da bixina no extrato de urucum é a 350 nm. O tempo de retenção (min) do Padrão de Bixina foi de 8,911 ± 0,008 e o da amostra de Urucum foi de 8,962 ± 0,008.

Anexo 3

Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA), do *Tail Moment* (TM) e do *Olive Tail Moment* (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa dos grupos controle, controle do solvente (0,4%DMSO) e urucum.

	% DNA		**TM**		**OTM**	
Grupo	**Média ± DP**	**P**	**Média ± DP**	**P**	**Média ± DP**	**P**
Controle	10,5 ± 8,4		14,2 ± 22,5		12,2 ± 14,1	
Controle solvente	9,2 ± 2,9	> 0,05	14,8 ± 18,3	> 0,05	14,2 ± 13,6	> 0,05
Urucum						
0,2 ug/mL	6,9 ± 4,2	> 0,05	3,5 ± 4,7	> 0,05	6,9 ± 6,1	> 0,05
0,5 ug/mL	7,5 ± 1,4	> 0,05	4,3 ± 3,7	> 0,05	7,2 ± 2,5	> 0,05
1,0 ug/mL	9,5 ± 1,2	> 0,05	8,1 ± 4,7	> 0,05	9,8 ± 3,4	> 0,05

Foram analisados 100 nucleóides/tratamento.
Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
P: teste de Tukey, médias comparadas aos grupos controles e cisplatina (cDDP) (p>0,05).

Anexo 4

Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA), do *Tail Moment* (TM) e do *Olive Tail Moment* (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa dos grupos controle, controle do solvente (0,4%DMSO), cisplatina, e pré-tratamento com urucum e tratamento com 0,1µg/mL de cisplatina.

Grupo	% DNA		TM		OTM	
	Média ± DP	**P**	**Média ± DP**	**P**	**Média ± DP**	**P**
Controle	10,5 ± 8,4		14,2 ± 22,5		12,2 ± 14,1	
Controle solvente	9,2 ± 2,9	> 0,05	14,8 ± 18,3	> 0,05	14,2 ± 13,6	> 0,05
cDDP						
0,1 µg/mL	7,9 ± 0,9	> 0,05	3,5 ± 2,2	> 0,05	7,0 ± 0,8	> 0,05
0,1 µg/mL + 0,4% DMSO	8,2 ± 1,3	> 0,05	6,4 ± 3,2	> 0,05	11,6 ± 0,9	> 0,05
Urucum+ 0,1µg/mL cDDP						
0,2 µg/mL	11,5 ± 4,6	> 0,05	12,2 ± 10,9	> 0,05	12,8 ± 6,9	> 0,05
0,5 µg/mL	8,8 ± 0,4	> 0,05	8,5 ± 5,7	> 0,05	9,5 ± 2,6	> 0,05
1,0 µg/mL	12,2 ± 10,6	> 0,05	13,4 ± 17,9	> 0,05	14,5 ± 14,7	> 0,05

Foram analisados 100 nucleóides/tratamento. Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
P: teste de Tukey, médias comparadas aos grupos controles e cisplatina (cDDP) (p>0,05).

Anexo 5

Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA), do *Tail Moment* (TM) e do *Olive Tail Moment* (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa dos grupos controle, controle do solvente (0,4%DMSO) e bixina.

	% DNA		**TM**		**OTM**	
Grupo	**Média ± DP**	**P**	**Média ± DP**	**P**	**Média ± DP**	**P**
Controle	23,3 ± 6,7		92,0 ± 22,3		35,0 ± 10,4	
Controle solvente	18,3 ± 10,0	> 0,05	90,5 ± 23,6	> 0,05	29,4 ± 11,2	> 0,05
Bixina						
0,05 µg/mL	12,4 ± 3,0	> 0,05	26,3* ± 3,9	< 0,01	15,1 ± 3,3	> 0,05
0,08 µg/mL	8,5 ± 3,3	> 0,05	18,9* ± 3,6	< 0,001	11,2* ± 5,9	< 0,05
0,10 µg/mL	7,5* ± 2,5	< 0,05	10,1* ± 0,6	< 0,001	8,1* ± 2,3	< 0,01

Foram analisados 100 nucleóides/tratamento.
Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
P: teste de Tukey, médias comparadas aos grupos controles e cisplatina (cDDP) (p>0,05).

Anexo 6

Valores médios ± Desvio Padrão (DP) da porcentagem de DNA na cauda (%DNA), do *Tail Moment* (TM) e do *Olive Tail Moment* (OTM) obtidos pelo Ensaio Cometa dos grupos controle, controle do solvente (0,4%DMSO), cisplatina, e pré-tratamento com bixina e tratamento com 0,1µg/mL de cisplatina.

Grupo	% DNA		TM		OTM	
	Média ± DP	**P**	**Média ± DP**	**P**	**Média ± DP**	**P**
Controle	23,3 ± 6,7		92,0 ± 22,3		35,0 ± 10,4	
Controle solvente	18,3 ± 10,0	> 0,05	90,5 ± 23,6	> 0,05	29,4 ± 11,2	> 0,05
cDDP						
0,1 µg/mL	16,5 ± 10,1	> 0,05	82,1 ± 28,4	> 0,05	30,3 ± 8,1	> 0,05
0,1 µg/mL + 0,4% DMSO	14,6 ± 0,7	> 0,05	85,0 ± 20,1	> 0,05	28,2 ± 7,9	> 0,05
Bixina+ 0,1µg/mL cDDP						
0,05 µg/mL	11,3 ± 7,3	> 0,05	24,9* ± 11,5	< 0,01	11,6* ± 6,1	< 0,05
0,08 µg/mL	8,5 ± 3,3	> 0,05	17,4* ± 5,6	< 0,01	10,7* ± 3,2	< 0,05
0,10 µg/mL	6,4 ± 2,0	> 0,05	9,9* ± 4,4	< 0,01	6,1* ± 0,9	< 0,01

Foram analisados 100 nucleóides/tratamento. Controle se refere às culturas não tratadas.
Controle solvente se refere às culturas tratadas com 0,4% de DMSO.
P: teste de Tukey, médias comparadas aos grupos controles e cisplatina (cDDP) (p>0,05).

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo