

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

CRISTIANO JOSÉ DA SILVA

**Avaliação da atividade citotóxica e/ou genotóxica dos fitoterápicos
Echinodorus grandiflorus Mitch. e *Cordia ecalyculata* Vell. e dos
fármacos femproporex, sibutramina e dietilpropiona usados para o
tratamento da obesidade**

**Ribeirão Preto
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CRISTIANO JOSÉ DA SILVA

**Avaliação da atividade citotóxica e/ou genotóxica dos fitoterápicos
Echinodorus grandiflorus Mitch. e *Cordia ecalyculata* Vell. e dos
fármacos femproporex, sibutramina e dietilpropiona usados para o
tratamento da obesidade**

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Prof^ª. Dra. Catarina Satie Takahashi

**Ribeirão Preto
2010**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

da Silva, Cristiano José

Avaliação da atividade citotóxica e/ou genotóxica dos fitoterápicos *Echinodorus grandiflorus* Mitch. e *Cordia ecalyculata* Vell. e dos fármacos femproporex, sibutramina e dietilpropiona usados para o tratamento da obesidade. Ribeirão Preto, 2010.

135p. il., 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Genética.

Orientadora: Prof^a. Dra. Catarina Satie Takahashi

1. Anorexígenos.
2. Genotóxico.
3. Citotóxico.
4. Ensaio Cometa.
5. Teste do micronúcleo.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA-HC/FMRP-USP)

Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP)

Secretaria de Estado da Educação do Estado de Goiás – SEEGO

Colégio da Polícia Militar de Goiás Ayrton Senna – CPMG-AS

AGRADECIMENTOS

Tenho gratidão perpétua a todos os entes que materialmente ou imaterialmente conspiraram em meu favor e inspiraram minha trajetória rumo ao bem. A todos os meus semelhantes que, amavelmente, nunca abstiveram de emprestar-me tuas forças, compartilhar teus carinhos, inteligência ou mesmo censurar-me em minhas fraquezas e desvios da retidão.

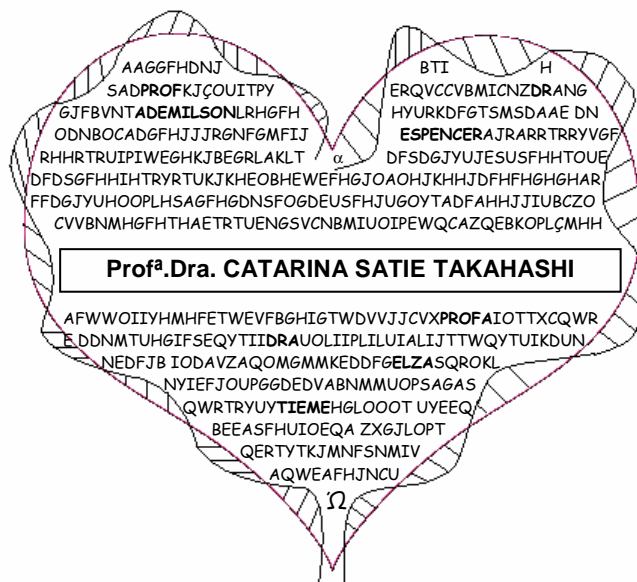
Tenho gratidão às instituições que ao longo do meu desenvolvimento intelectual me acolheram como extensão de meu lar.

Agradeço as cidades por onde andei e pude desenvolver minha sociabilidade. Tenho profunda gratidão à natureza que em minha janela vital oferece a cada dia maravilhosos espetáculos demonstrando sua grandeza e perfeição.

Agradeço a todas as forças produtivas que de seu labor e suor emana os recursos que financiam o desenvolvimento técnico-científico do país.

Agradeço aos outros animais que me presentearam com sua pureza, sua alegria despreziosa e que algumas vezes foram privados da vida por decisão humana com o nobre propósito de oferecer subsídios para a continuidade e melhoria da qualidade de vida na terra.

Aos muitos que omiti e tenho consciência que são a maioria e de igual importância aos que citei, recorro ao senso comum para demonstrar minha gratidão depositando-os hermeticamente em meu coração para que circulem no meu arcabouço corporal e nunca fujam da minha lembrança. Este coração está repleto de letras que se combinadas conseguirei compor a identificação de cada um de vocês; sintam-se contemplados não somente neste texto mais tenham a certeza que minha alma vibra emocionalmente grata por tudo que vocês representaram, representam ou irão representar em minha vida e na estrutura geral do universo.



SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Prólogo	1
1.2 Alterações Genéticas: mutagênese e carcinogênese	1
1.3 Obesidade	4
1.4 Obesidade e Câncer	8
1.5 Anorexígenos	10
1.6 Fitoterápicos	15
1.7 Perigo Invisível nos “Produtos Naturais”	22
1.8 Fitoterápicos Objetos Deste Estudo	23
1.9 Ensaio de Genotoxicidade	27
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Substâncias Químicas	31
3.2 Plantas	35
3.3 Preparo do Extrato Hidroetanólico	36
3.4 Protocolo de Tratamento dos Camundongos	36
3.4.1 Tratamento dos camundongos com femproporex ou sibutramina	37
3.4.2 Tratamento dos camundongos com extrato de <i>C. ecalyculata</i> ou <i>E. grandiflorus</i>	37
3.5 Teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongos	38
3.6 Teste do Micronúcleo em Sangue Periférico de Camundongo	39
3.7 Ensaio Cometa	40
3.8 Verificação da Eficácia dos Extratos Etanólicos de <i>C. ecalyculata</i> e <i>E. grandiflorus</i> no Tratamento da Obesidade	43
3.9 Cultura de Células CHO	43
3.10 Tratamentos com Dietilpropiona	43
3.11 Determinação do Índice Apoptótico	44
3.12 Teste do Micronúcleo em Cultura de Células CHO	45

3.13 Índice de Divisão Nuclear (IDN)	45
3.14 Linfócitos de Indivíduos Obesos	46
3.15 Tratamentos dos Linfócitos	46
3.16 Teste de Viabilidade Celular com Azul de Tripán	47
3.17 Análise Estatística	47
4. RESULTADOS	48
4.1 Teste do Micronúcleo em Células de Medula Óssea de Camundongo	48
4.1.1 Avaliação de sibutramina e femproporex	48
4.1.2 Avaliação dos extratos de <i>E. grandiflorus</i> e <i>C. ecalyculata</i>	51
4.2 Teste do Micronúcleo em Sangue Periférico de Camundongo	53
4.2.1 Avaliação de sibutramina e femproporex	53
4.2.2 Avaliação dos extratos de <i>C. ecalyculata</i> e <i>E. grandiflorus</i>	54
4.3 Teste do Micronúcleo em Cultura de CHO Tratadas com Dietilpropiona	56
4.4 Teste do Micronúcleo em Linfócitos de Indivíduos Obesos	57
4.4.1 Avaliação dos fármacos sibutramina e femproporex	57
4.4.2 Avaliação dos extratos de <i>C. ecalyculata</i> e <i>E. grandiflorus</i>	59
4.5 Ensaio Cometa	60
4.5.1 Avaliação do femproporex e sibutramina em sangue periférico de camundongos	60
4.5.2 Avaliação dos extratos de <i>C. ecalyculata</i> e <i>E. grandiflorus</i> em sangue periférico de camundongos	62
4.5.3 Avaliação do femproporex e sibutramina em linfócitos de indivíduos obesos	63
4.5.4 Avaliação dos extratos de <i>C. ecalyculata</i> e <i>E. grandiflorus</i> em linfócitos de indivíduos obesos	64
4.5.5 Avaliação do fármaco dietilpropiona em cultura de CHO	65
4.6 Avaliação da Eficácia dos Extratos de <i>C. ecalyculata</i> e <i>E. grandiflorus</i>	66
4.7 Avaliação da Viabilidade Celular para Tratamento CHO com dietilpropiona	67
5. DISCUSSÃO	69
5.1 Sibutramina e Femproporex em Camundongo	69
5.2 <i>C. ecalyculata</i> e <i>E. grandiflorus</i> em Camundongo	76
5.3 Dietilpropiona em Cultura de CHO	79
5.4 Sibutramina e Femproporex em Linfócitos de Indivíduos Obesos	83
5.5 <i>C. ecalyculata</i> e <i>E. grandiflorus</i> em Linfócitos de Indivíduos Obesos	85

6. CONCLUSÕES	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXO A	103
ANEXO B	109
ANEXO C	120
ANEXO D	130
ANEXO E	131
ANEXO F	132
ANEXO G	135

RESUMO

A *Cordia ecalyculata* Vell. e *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli são espécies amplamente utilizadas no Brasil como preparações terapêuticas por grupos indígenas e população em geral. Estas plantas têm sido utilizadas na medicina popular como tônico, diurético, antiinflamatórios supressores de apetite, para o tratamento de picadas de cobra, e perda de peso. Neste estudo, verificou-se os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos dos extratos de *Cordia ecalyculata* e *Echinodorus grandiflorus*, bem como a sua eficácia no tratamento da obesidade. O Teste de Micronúcleos foi utilizado para a avaliação de possíveis efeitos clastogênicos/aneugênicos e o Ensaio Cometa foi utilizado para a avaliação de quebras na fita DNA. Os efeitos citotóxicos dos extratos brutos foram verificados pela razão PCE/NCE e camundongos Swiss (*Mus musculus*) foram utilizados como modelo experimental. Observou-se significativo aumento ($P < 0,05$), independente da dose, na frequência média de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico nos camundongos tratados com extrato de *C. ecalyculata* ou de *E. grandiflorus*, em comparação com o controle negativo. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na frequência de micronúcleos de eritrócitos policromáticos, tratados com os extratos. Observamos que o tratamento com o extrato de *C. ecalyculata* nas concentrações de 1000 e 2000 mg / kg m.c resultou em uma proporção PCE / NCE maior ($P < 0,05$) que a do controle negativo. Após 15 dias de tratamento diário, com dose de 2000 mg / kg m.c de fitoterápicos não houve redução do ganho de massa corporal, nem na quantidade de alimento consumido por camundongos Swiss quando comparado com o controle negativo ($P > 0,05$). Os resultados deste estudo permitem inferir que os extratos de *Cordia ecalyculata* e *Echinodorus grandiflorus* não exibem atividade citotóxica ou genotóxica. Entretanto, eles possuem fraca atividade clastogênica/aneugênica (sem significância) em células do sangue periférico. Ao contrário de algumas crenças populares foi encontrado neste estudo que os extratos não são eficazes para o tratamento da obesidade. Medicamentos antiobesidade merecem considerações especiais no presente momento devido a um número crescente de pessoas com sobrepeso e obesos que necessitam destas terapêuticas alternativas. A obesidade está positivamente associada com várias doenças crônicas, incluindo câncer. Neste trabalho, também avaliamos possíveis ações genotóxica e / ou citotóxica de dois anorexígenos, a sibutramina e o femproporex, nas doses de 10, 20 e 40 mg / kg de m.c, administrados intraperitonealmente em camundongos Swiss machos. O efeito genotóxico foi analisado pelo Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo. Descobrimos que

ambos os medicamentos aumentaram a frequência de danos genotóxico sem camundongos Swiss, mas não apresentaram atividade citotóxica para eritrócitos policromáticos da medula óssea destes animais.

Nos tratamentos *in vitro* os fármacos sibutramina, femproporex e dietilpropiona induziram danos genotóxicos, enquanto os fitoterápicos *Cordia ecalyculata* e *Echinodorus grandiflorus* induziram apenas fraca atividade genotóxica. Verificamos também que a dietilpropiona interfere na viabilidade de células CHO, aumentando o índice de apoptose. O estudo comparativo para verificar a sensibilidade do equipamento de eletroforese (para Ensaio Cometa) desenvolvido em nosso laboratório, confirmou por meio da avaliação de três substâncias genotóxicas (doxorubicina, etoposido e cloridrato de epirrubicina), que o equipamento apresenta sensibilidade similar ao usado convencionalmente. Para avaliação dos dados deste trabalho usamos os testes estatísticos ANOVA e teste t de Student.

ABSTRACT

Cordia ecalyculata Vell. and *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltldl.) Micheli are extensively used in Brazil as therapeutic preparations by indigenous groups and the general population. These plants have been used in the folk medicine as: tonic, diuretic, anti-inflammatory, appetite suppressants, for the treatment of snake bites, and weight loss. In this study, it was verified the possible cytotoxic and genotoxic effects of the crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*, as well as their effectiveness in treating obesity.

The Micronucleus Test was used for the evaluation of possible clastogenic and aneugenic effects, and the Comet Assay was used for the evaluation of single-strand and double-strand DNA breaks. The cytotoxic effects of the crude extracts were verified by PCE/NCE ratio. Swiss mice (*Mus musculus*) were used as the experimental model.

It was observed a significant ($P < 0.05$) increase, dose-independent, in the average frequency of micronucleated erythrocytes in peripheral blood in mice treated with either the *Cordia ecalyculata* or *Echinodorus grandiflorus* extracts, in comparison with the negative control. There were no significant differences ($P > 0.05$) in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes for both extract treatment. We observed that treatment with the *Cordia ecalyculata* extract at concentrations of 1000 and 2000 mg/kg bw resulted in a PCE/NCE ratio that was larger ($P < 0.05$) than the negative control. After 15 days of daily treatment, a dose of 2000 mg/kg bw of either phytotherapeutic did not reduce body mass gain or the amount of food consumed by Swiss mice when compared with the negative control ($P > 0.05$). The results of this study allowed us to infer that the crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus* do not display cytotoxic or genotoxic activities. However, they do possess weak clastogenic activity (without significance) on peripheral blood cells. Contrary to commonly held beliefs it was also found in this study that the extracts are not effective for obesity treatments.

Anti-obesity medications deserve special considerations at the present time due to an increasing number of overweight and obese people who require these therapeutic alternatives. Obesity is positively associated with several chronic illnesses, including cancer. In this work, we evaluated the possible genotoxic and/or cytotoxic actions of two drugs, sibutramine and fenproporex, in the doses of 10, 20 and 40 mg/kg bw, administered intraperitoneally in male Swiss mice. The genotoxic effect was analyzed by comet assay and micronucleus test. We found that both drugs

increased the frequency of genotoxic damage in Swiss mice, but did not present cytotoxic activities towards the polychromatic erythrocytes of the bone marrow of these animals.

The drugs sibutramine and fenproporex diethylpropiona induced genotoxic damage when treated in vitro, while the extracts of herbal *Cordia ecalyculata* or *Echinodorus grandiflorus* induced only weak genotoxic activity. The diethylpropion interfere with the viability of CHO cell, increases the rate of apoptosis. The comparative study to investigate the sensitivity of electrophoresis equipment (for comet assay) developed in our laboratory confirmed through the evaluation of three substances (doxorubicin, etoposide and epirubicin hydrochloride), that the equipment has a similar sensitivity. To evaluate the data of this study was used ANOVA and Student't test.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Prólogo

Neste trabalho estudou-se alguns parâmetros relacionados ao potencial de risco citotóxico e/ou genotóxico de três fármacos anorexígenos, sibutramina, femproporex e dietilpropiona. Também avaliou-se este potencial para os extratos de *Cordia ecalyculata* e *Echinodorus grandiflorus*. Ao lado deste eixo principal do estudo foram realizadas investigações quanto à eficácia destes extratos para o tratamento de obesidade. Seguindo a mesma dinâmica foram feitas investigações experimentais objetivando desenvolver um equipamento de eletroforese específico para o Ensaio Cometa.

Desta forma, foram utilizados para estas avaliações o Ensaio Cometa, Teste do Micronúcleo e Testes de Viabilidade Celular. Como sistema experimental utilizou-se para os testes *in vivo* camundongos Swiss e *in vitro* utilizou-se células do ovário de hamster Chinês (CHO), linfócitos humanos e células de fibroblasto de hamster (V79). Por apresentar esta diversidade de avaliações os resultados foram dispostos de acordo com o teste avaliado e subdivididos pela substância e o sistema teste utilizado. Para deixar o texto melhor legível o estudo para desenvolvimento do equipamento de eletroforese foi colocado em anexo.

1.2 Alterações Genéticas: mutagênese e carcinogênese

O termo mutação, foi introduzido por De Vries em 1901, para descrever mudanças genéticas súbitas na planta *Oenothera lamarckiana* (Vogel e Motulsky, 2000). A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (Tubiana, 2009). De todos os casos de cânceres, 80 a 90% estão associados a fatores ambientais. Alguns fatores são bastante conhecidos como o cigarro e o câncer de pulmão, outros ainda estão sendo avaliados e muitos são completamente desconhecidos (Ribeiro *et al.*, 2003). As mutações podem ocorrer tanto em células germinativas quanto em células somáticas e dependendo dos genes envolvidos, pode ou não haver efeitos fenotípicos (Bertram, 2001).

Desde muito tempo sabe-se que a tumorigênese é um processo de múltiplas etapas, mas somente há alguns anos atrás foi possível identificar os eventos moleculares responsáveis pela iniciação e progressão dos tumores humanos. Os tumores de cólon e reto são excelentes modelos

para os estudos e pesquisas dos mecanismos de alterações genéticas envolvidos no desenvolvimento de neoplasias; os dados clínicos e histopatológicos sugerem que a maioria, se não todos, os tumores malignos de cólon e reto, originam de tumores benignos pré-existentes. Além disso, foi possível compreender que tanto os fatores ambientais quanto os hereditários contribuem para o desenvolvimento de neoplasias. Os tumores de cólon e reto parecem originar da ativação mutacional de oncogênese juntamente com inativação mutacional de genes supressores de tumor. São requeridas mutações em pelo menos 4 genes para formação do tumor maligno, de forma que poucas mudanças são necessárias para iniciar a tumorigênese. Embora as mutações ocorram aleatoriamente o total de alterações acumuladas são responsáveis pelas propriedades biológicas determinantes do tumor. Em alguns casos o gene supressor de tumor mutante parece exercer um efeito fenotípico quando presente na forma heterozigota. De modo que alguns genes supressores de tumor podem não ser recessivos a nível celular. Desta forma este modelo geral pode ser aplicado à maioria dos tumores humanos (Fearon e Vogelstein, 1990).

Aproximadamente 10% dos cânceres no endométrio originam devido à predisposição genética. A doença resulta de uma deficiência hereditária no sistema de reparo, MMR (mismatch repair) (Cohn *et al.*, 2008). Provavelmente todos os tumores malignos e leucemias devem suas origens a mutações somáticas, que afetam uma única célula, que adquire vantagem seletiva de crescimento em relação as suas células irmãs (Nery, 1976). Em geral, várias mutações somáticas adicionais são necessárias para o desenvolvimento da malignidade (Turker, 2000).

A instabilidade genética é um passo necessário para a geração de mutações que causam o desenvolvimento tumoral. Este conceito tem sido reforçado pelo estudo de instabilidade de microssatélites e por alteração numérica de cromossomos. A descoberta do aumento da taxa de mutação em cânceres do cólon e reto com a inativação somática de genes de reparo (mismatch repair) representou a primeira grande evidência do papel da instabilidade genética na etiologia de cânceres humanos. A instabilidade genética indica uma taxa de mutação elevada em relação ao que é observado em células normais (Gorringe *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de tumor é coordenado pela seleção celular, isto implica que somente aberrações cromossômicas, que permitem a sobrevivência celular ou promovem vantagem seletiva na divisão celular estão presentes no tumor. A seleção atuará nas aberrações cromossômicas tanto de origem espontânea quanto as provindas de instabilidade genética (Gorringe *et al.*, 2005). Em seres humanos, acredita-se que ocorram de 4 a 7 eventos mutacionais,

requerendo às vezes de 20 a 40 anos para induzir o câncer (Loeb e Christians, 1996). Em alguns casos raros de câncer, a herança é mendeliana, e uma simples mudança tem papel fundamental na determinação do tumor. Por exemplo, mutação no gene p53, regulador do ciclo celular, pode levar ao desenvolvimento de neoplasias (Shay e Wright, 2005; Braithwaite *et al.*, 2005). Apesar da instabilidade genética denotar uma elevada taxa de mutação em relação à observada em células normais, somente as aberrações cromossômicas que permitem a sobrevivência e divisão das células estarão presentes em um tumor (Gorringe *et al.*, 2005).

Os efeitos mutagênicos causados por um grande número de compostos foram observados em uma ampla variedade de organismos de teste. Nos efeitos, como mutações genômicas, quebras e rearranjos cromossômicos e mutações de ponto, o significado genético é óbvio, pois a maioria dos tumores é iniciada por mutações somáticas (Vogel e Motulsky, 2000). É de grande importância para saúde pública testar as drogas e substâncias químicas, pois deste modo seria possível ter uma estimativa mínima da carga genética adicional devida a mutações quimicamente induzidas. Atualmente, poucos esforços estão sendo investidos pela sociedade para estimar os riscos criados pelos mutágenos químicos (Nebert e Roe, 2001). Existe, entretanto, uma crescente consciência de que as substâncias químicas a serem introduzidas, com os medicamentos ou pesticidas, devam ser testadas quanto a mutagenicidade e carcinogenicidade (Vogel e Motulsky, 2000; Snyder e Green, 2001). A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas é freqüentemente usada como indicador para o câncer, uma vez que os testes mutagênicos medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (Fearon e Vogelstein, 1990). Assim os testes de toxicidade genética são utilizados rotineiramente para avaliar o espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos (Snyder e Green, 2001). A associação íntima de indicadores biológicos, bem caracterizados e facilmente quantificados, com os mecanismos conhecidos de ativação de protooncogênes ou perda de função de genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade (Ribeiro *et al.*, 2003).

Os testes genotóxicos permitem identificar riscos de danos ao DNA bem como, sua fixação. A fixação do dano em DNA na forma de mutações gênicas, danos cromossômicos ou recombinação é essencial nos efeitos hereditários e nos multi-passos do desenvolvimento de tumores. Compostos que são positivos nos testes que detectam danos genotóxicos têm potencial para ser carcinogênico e/ou mutagênico para os humanos (ICH, 2008).

1.3 Obesidade

A indagação se a obesidade é ou não uma doença foi amplamente debatida nas últimas duas décadas. Doenças agudas como pneumonia e faringite são normalmente curáveis. Doenças crônicas como hipertensão e obesidade, por outro lado, podem ser tratadas, mas voltam a ter remissão e são de longa duração. A obesidade é uma doença crônica, se julgarmos do ponto de vista do sofrimento pessoal enfrentado pelo indivíduo afetado, ou pelos custos para o sistema de saúde pública e a sociedade (Ravussin e Bouchard, 2000).

A obesidade resulta da disfunção crônica do balanço energético. Em longo prazo o balanço entre energia ingerida e energia gasta, determina a quantidade de energia estocada no corpo. Quando a energia ingerida excede cronicamente a energia despendida, há o desequilíbrio que provoca a expansão das células gordurosas. Hipertrofia e hiperplasia das células gordurosas representa a única patologia da obesidade. O aumento das células gordurosas está associado ao desenvolvimento de outros distúrbios metabólicos que podem desencadear outras doenças. É de consenso que a obesidade resulta de deficiência no gasto energético e incapacidade de controlar a ingestão de alimentos, num ambiente propício ao sedentarismo, no qual os alimentos com altos valores energéticos e palatáveis são facilmente obtidos (Ravussin e Bouchard, 2000).

Uma importante questão suscitada é por que o aumento do estoque de gordura não produz um sinal para o cérebro reduzir a ingestão de alimentos em algumas pessoas, mas o faz em outras? Uma outra questão é por que algumas pessoas não são capazes de aumentar sua taxa metabólica ou atividade física para equilibrar com o alto nível calórico ingerido?

Desde a descoberta da leptina, há alguns anos atrás, ficou conhecido que a obesidade não é devida apenas à falta de controle que resulta em indolência e glotonaria, mas pode também ser conseqüência de defeitos metabólicos, apesar disso, preconceito e discriminações ainda aflige a vida dos obesos. O estigma derivado do culto a magreza adotado por mentes acrílicas, provocam descontentamento geral em relação a massa corporal. Embora o impacto da obesidade possa afetar de forma mais direta o indivíduo obeso e seus familiares; ela é um problema de saúde pública e deve ser enfrentado por toda a sociedade. A obesidade é uma doença crônica com consideráveis conseqüências pessoais e sociais. A indústria farmacêutica, ávida por lucros, percebe nisso enorme oportunidade para ampliar seu poderio econômico, caso desenvolva drogas anorexígenas eficazes e seguras (Ravussin e Bouchard, 2000).

A obesidade resulta de um conjunto de transtornos patológicos, cuja característica principal é a expansão da gordura corporal acima dos limites fisiológicos. Os fatores etiológicos da obesidade ainda não estão totalmente esclarecidos, mas é evidente que está presente o componente genético bem como fatores ambientais, hábitos alimentares, estilo de vida, atividades físicas, grau de educação e hábitos sociais na expressão clínica da doença (Silveira e Carraro, 2005).

Muitos pesquisadores acreditam numa solução para o problema pela terapia gênica. Enquanto a terapia gênica não conseguir reparar possíveis danos em genes envolvidos na etiologia da obesidade, ela continuará sendo tratada como uma enfermidade crônica cuja manifestação clínica só pode ser controlada através de medidas constantes e apropriada. A terapia farmacológica é uma importante aliada no tratamento da obesidade, ainda mais, se for combinadas com medidas dietéticas, atividades físicas, mudança de comportamento e sociais, e quando falham todas estas tentativas recomendam-se à cirurgia bariátrica, que é um ato invasivo e não deve transformar-se em modismo. Num indivíduo obeso os mecanismos que regulam o balanço energético estão afetados em um ou mais níveis, de forma que a ingestão calórica é cronicamente superior à energia dissipada pelo organismo. O excedente energético se acumula progressivamente na forma de triglicérides no interior dos adipócitos. Desse modo a terapia farmacológica visa atuar tanto no sentido de reduzir a ingestão calórica, intervindo a nível central e periférico sobre o controle do apetite, da saciedade e da ingestão alimentar; quanto no sentido de regular a energia consumida pela elevação da termogênese. A maior dificuldade no tratamento é encontrar uma droga ideal que associe efetividade na redução da massa corporal com segurança toxicológica. A classe de recursos farmacológicos que mais se desenvolveu são a dos anorexígenos derivados direta ou indiretamente da anfetamina (Silveira e Carraro, 2005).

Deve-se deixar claro que a terapia farmacológica, é um recurso adicional no contexto integral do tratamento da obesidade; deve ser recomendada quando o índice de massa corporal for maior ou igual a 27 kg/m^2 se coexiste outra enfermidade ou notar riscos metabólicos e cardiovasculares ou, 30kg/m^2 independente de outras comorbidades (Silveira e Carraro, 2005).

A deposição de tecido adiposo nas vísceras intra-abdominais caracteriza a obesidade central. Normalmente é avaliada pela circunferência do quadril, e é considerado o maior fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão, elevação da concentração de insulina plasmática e resistência à insulina, hiperglicemia e hiperlipidemia (síndrome metabólica). O preocupante é que

o risco de perda da saúde está associado com aumento da massa corporal, e ocorre principalmente em crianças ou pessoas jovens (Kopelman, 2007).

Para classificar o indivíduo com sobrepeso ou obeso usa-se o índice de massa corporal. O (IMC) é definido como a massa corporal em quilogramas (Kg) dividida pelo quadrado da altura corporal em metros (m). O IMC de 19 a 25 Kg/m² é considerado normal para indivíduos entre 19-34 anos de ambos os sexos (Behar, 2002). Indivíduos com IMC > 25Kg/m² são enquadrados no grupo com sobrepeso, e indivíduos com IMC > 30Kg/m² são classificados como obesos (Calle *et al.*, 2003).

A medida da massa é apenas um simples índice antropométrico de excesso de gordura no corpo; pois através dela não se distingue a massa estrutural do corpo (músculo, ossos, água extracelular) de tecido adiposo, de modo que a medida de massa ajustada à altura oferece melhor aproximação da proporção ou da quantidade total de tecido adiposo no corpo do que apenas a massa isolada.

A obesidade alcançou proporções epidêmicas globais com mais de 1 bilhão de indivíduos adultos com sobrepeso, e não menos que 300 milhões dos quais clinicamente obesos. Pessoas com sobrepeso ou obesidade têm maior possibilidade de desenvolver doenças crônicas como diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, hipertensão, derrames e certas formas de câncer. Como consequência direta aumenta o risco de morte prematura e reduz a qualidade de vida (Bianchini *et al.*, 2002; WHO, 2006).

Na maioria das pessoas a massa corporal é mantida em condições estáveis. Os humanos podem manter a mesma massa corporal por muitos anos; para ter uma massa constante deve haver equilíbrio no balanço energético. Um número crescente de pessoas, incluindo crianças sofre de obesidade, principalmente nas sociedades ocidentais. Crianças com sobrepeso possuem maiores riscos de se tornarem adultos com sobrepeso. Nos Estados Unidos da América, a prevalência de obesidade é muito alta. De 1999-2002, 65% dos adultos estavam com sobrepeso e destes 30,4% são obesos, 16% das crianças (6–19 anos) estavam com sobrepeso. Em 2002 a prevalência de obesidade na Europa variava de 9% na Itália a 30% na Grécia. De forma que o aumento da obesidade está ocorrendo em todas as idades, gêneros e grupos étnicos (Baskin *et al.*, 2005; Klok *et al.*, 2007). Também, a transição econômica experimentada por muitas nações em desenvolvimento, tem sido associada à diminuição do nível de atividades físicas destas populações, e conseqüentemente com aumento dos índices de obesidade (Bianchini *et al.*, 2002).

A morbidade aumenta gradualmente com o aumento do IMC. Entretanto, muitos pesquisadores afirmam que os mecanismos relacionados ao equilíbrio da ingestão e gasto de energia, envolvidos na determinação da massa corporal, é um complexo sistema incluindo fatores periféricos e centrais. Dois hormônios importantes na regulação da ingestão de alimento e massa corporal são leptina e grelina. Ambos originados periféricamente, mas enviam sinais para o cérebro particularmente para o hipotálamo. No hipotálamo a ativação de receptores de leptina e grelina sinalizam uma cascata que leva a mudança na ingestão de alimentos (Klok, 2007).

O controle do apetite em humanos resulta de uma complexa interação envolvendo fatores neuroanatômicos, genéticos, endocrinológicos, patofisiológicos, nutricionais, físicos, psicológicos, e sócio-ambientais resultando na experiência perceptível de fome e saciedade. O apetite e saciedade são mediados por complexas vias de sinalização neuroendócrina que envolve mais de 40 hormônios, neuropeptídeos, enzimas e outros mensageiros químicos e seus receptores.

Apesar de haver vários peptídeos com potencial para desenvolvimento de drogas anti-obesidade, somente 4 classes de agentes estão aprovadas: catecolaminas estimulantes, inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina, inibidores de lipase e antagonista do receptor canabinóide-1. Os efeitos clínicos destas drogas conferem uma singela melhoria e muitos efeitos negativos nos tratamentos a longo prazo (Atkinson, 2008).

Em todo mundo, o sobrepeso e a obesidade causam mais mortes que a subnutrição. A combinação destes riscos relacionados à dieta e a inatividade física em países de baixa e média renda é similar ao causado pelo HIV/AIDS e tuberculose. Na atualidade 65% da população mundial vive em países onde a obesidade e sobrepeso mata mais pessoas que a subnutrição (WHO, 2009).

Até recentemente, as pesquisas sobre equilíbrio energético e obesidade enfatizavam apenas as vias neuroendócrinas, envolvidas no controle da ingestão de alimento pelo hipotálamo, e nos mecanismos periféricos de dispêndio de energia. O tecido adiposo branco tem na atualidade chamado à atenção de pesquisadores por ser considerado o maior órgão de sinalização e endócrino do organismo (Trayhurn, 2007).

A obesidade é um problema global, cujo controle envolve esforço pessoal, governamental, pesquisas científicas, aperfeiçoamento cultural e reestruturação das condições humanas para viverem na modernidade técnico-científica.

1.4 Obesidade e Câncer

A obesidade é uma condição sub-inflamatória que representa fator de risco para o desenvolvimento de câncer e várias outras doenças. O tecido adiposo secreta fatores biológicos ativos, como a leptina que tem conhecida atividade pró-inflamatória ou mitogênica. Tanto a inflamação crônica quanto a proliferação celular, são considerados fatores importantes para o desenvolvimento do câncer. Na atualidade, diversos recursos fitoquímicos têm sido mais bem explorados por apresentarem propriedades que inibem a proliferação celular (Schnabele *et al.*, 2009).

O câncer de endométrio é a doença ginecológica maligna mais comum nos Estados Unidos da América, enquanto a obesidade é um dos conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer do endométrio. A associação entre o aumento da massa corporal e câncer do endométrio, é hipoteticamente atribuída a um ambiente rico em fatores mitogênicos, ou elevado nível de estrógenos circulantes. Este ambiente possivelmente desenvolve, ou devido à aromatização dos estrógenos no tecido adiposo, ou devido a diminuição dos hormônios sexuais ligados à globulina. Estudos moleculares do câncer do endométrio identificaram várias alterações genéticas que desempenham papel crítico no desenvolvimento de malignidade. A instabilidade de microssatélites é um fenótipo normalmente encontrado em câncer de cólon, e também são encontrados associados com 20-30% de câncer do endométrio. Normalmente a replicação de erro é corrigida pelo sistema de reparo de DNA (mismatch repair). O mal funcionamento deste sistema, resulta em replicação dos erros juntamente com os microssatélites, originando o que denominam instabilidade de microssatélites (McCourt *et al.*, 2007).

O risco de câncer em pessoas obesas é similar ao risco de câncer de usuários de tabaco, de acordo com “American Cancer Society”. Segundo alguns especialistas, a obesidade pode brevemente superar o tabaco, tornando-se a primeira causa de mortes evitáveis (Calle *et al.*, 2003).

A massa corporal elevada afeta intensamente determinados fatores metabólicos, que exercem papel de destaque no aumento do risco de câncer. Estes fatores são representados principalmente pelo nível de peptídeos e hormônios esteróides circulantes, e seus fatores de ligação. A insulina circulante aumenta linearmente seu nível com o aumento do IMC, tanto em homem quanto, em mulher. Devido ao consumo excessivo de calorias e ganho de peso os tecidos tornam-se resistentes a insulina e, o corpo tenta compensar isso produzindo mais insulina, o que

resulta em hiperinsulinemia crônica. A obesidade, em particular a obesidade abdominal é o maior fator determinante de resistência à insulina e hiperinsulinemia. Os fatores de crescimento ligados à insulina (IGFs) são mitógenos que regulam os processos de crescimento dependentes de energia. O IGF-1 estimula a proliferação celular e inibe a apoptose e é considerado possuidor de forte efeito mitogênico, afetando uma ampla variedade de linhagem de células tumorais. A síntese de IGF-1 e sua principal proteína de ligação IGFBP-3 (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins) são reguladas pelo hormônio de crescimento (GH), produzido na glândula pituitária (hipófise). A obesidade e outras condições relacionadas com a hiperinsulinemia crônica diminuem o nível de proteínas de ligação ao IGF e em consequência aumenta o nível plasmático de IGF-1 livre. A insulina e o IGF-1 livre interagem e regulam a síntese e biodisponibilidade de hormônios esteróides importante no prognóstico de certos tumores. A hiperinsulinemia crônica inibe a síntese hepática de hormônios sexuais ligados a globulinas (SHBG), e aumenta a biodisponibilidade de andrógenos e estrógenos não ligados a globulinas (Calle, 2007).

O excesso de massa corporal e a obesidade podem ter papel significativo no número de morte por câncer 7 - 41% de certos tipos de cânceres são atribuídos ao sobrepeso e obesidade (WHO, 2009). O resultado de um estudo que envolveu em torno de 1 milhão de pessoas, indicou que 14% de mortes por câncer em homens e 20% em mulheres, podem ser devido ao sobrepeso e a obesidade. Pessoas com sobrepeso e obesos têm alto risco de morte por vários cânceres, incluindo esôfago, cólon, reto, fígado, vesícula biliar, pâncreas, rim, linfoma e mieloma múltiplo, quando comparado com pessoas de peso normal (Calle *et al.*, 2003). Os pesquisadores não estão certos de como a obesidade pode aumentar o risco de morte por câncer, mas sugerem que o alto nível de hormônio, comum em pessoas com elevados IMC, possa predispor ao câncer (Calle *et al.*, 2003).

Para tratamento medicamentoso da obesidade, muitos indivíduos usam uma série de substâncias (fórmulas para emagrecimento), que não apresentam respaldo científico (Fridman, 2000). Essa estratégia, além de perigosa, não traz benefícios em longo prazo, fazendo com que o paciente retorne ao peso anterior ou até ganhe mais peso do que o seu inicial (Almeida *et al.*, 2000; Behar, 2002)

Em um trabalho realizado por Almeida *et al.*, (2000), na região de Araraquara, Estado de São Paulo, Brasil, verificou-se que 40% dos medicamentos para obesidade classificados comercialmente como produtos naturais, continham anorexígenos e diazepam (ansiolítico). Em

relação ao Brasil, o relatório da JIFE (Junta Internacional de Fiscalização de Entorpecentes), publicado em março de 2005, revela um consumo exagerado de moderadores de apetite e solicita que o governo tome providências para enfrentar essa questão. Segundo o relatório, houve um aumento de 500% no consumo de anorexígenos entre os anos de 1998 a 2005 (JIFE, 2005). O consumo de anorexígenos no Brasil é de, aproximadamente, 23,6 toneladas por ano e 60% da produção mundial de femproporex, é usada por laboratórios farmacêuticos e farmácias de manipulação brasileiras (Almeida *et al*, 2000). Este uso maciço de substâncias anorexígenas pode estar contribuindo para aumentar o risco do desenvolvimento de tumores.

O grupo de trabalho sobre estratégias preventiva para câncer da “The International Agency for Research on Cancer (IARC)” publicou avaliação da literatura referente a massa corporal e câncer que considera os aspectos epidemiológicos, clínicos e dados experimentais. E concluíram que a redução do ganho de massa está associada a redução do risco de desenvolver câncer de cólon, mama, endométrio, rim e esôfago (IARC, 2002).

Ao estudarem os efeitos da perda de peso na prevenção de câncer de mama, e do endométrio concluíram que a perda de peso, reduz significativamente, o risco de desenvolvimentos destes cânceres durante a vida do indivíduo. Uma associação entre sobrepeso e obesidade com câncer em vários locais no organismo é consistente com estudo em modelos animais e, a restrição calórica diminui significativamente a incidência de tumores espontâneos e induzidos por carcinógenos, bem como, a metástase, o tamanho e crescimento. Os possíveis mecanismos envolvidos nestas observações incluem: alteração do metabolismo de carcinógenos, diminuição do dano oxidativo, aumento da capacidade de reparo de DNA e redução do nível de IGF-1 em animais com restrição calórica (Calle, 2007).

1.5 Anorexígenos

Hipócrates afirmou que a melhor maneira para perder peso é comer menos, e exercitar mais. Vinte e quatro séculos depois a dieta e o exercício ainda são os melhores tratamentos aconselhados aos pacientes. Modificação comportamental ou terapia comportamental é agora padrão em muitos programas de tratamento da obesidade. O objetivo é mudar o estilo de vida do paciente oferecendo-lhe suporte para aumentar a atividade física, e diminuir a ingestão de alimentos. Para alcançar isto muitas estratégias têm sido desenvolvidas como, por exemplo:

começar um trabalho com as crianças e envolver todos os seus familiares, tem obtido bastante sucesso.

A literatura apresenta que a maioria dos indivíduos que experienciam perda de peso no início das terapias normalmente voltam a ganhá-los entre 1 e 5 anos depois. Por esta razão a mudança voluntária de comportamentos parece não ser suficiente para o sucesso do tratamento e muitos pacientes obesos necessitam do suporte medicamentoso (Ravussin e Bouchard, 2000).

O surgimento de modernos medicamentos para obesidade reporta ao século passado com o uso de extratos da tireóide. Entretanto os hormônios da tireóide caíram em desuso, devidos a seus efeitos adversos nos sistemas cardiovascular e musculoesquelético. Nos anos de 1920, foi descoberto o dinitrofenol ao constatar que trabalhadores expostos a este produto químico perdiam massa corporal. Este efeito era devido ao desacoplamento da fosforilação de ATP do consumo de oxigênio. No entanto, verificaram logo que o tratamento com dinitrofenol estava também associado com neuropatias e catarata. Então as anfetaminas foram introduzidas mostrando eficácia no tratamento da obesidade, mas também apresentam efeitos adversos. Apesar das limitações das formas correntes de tratamento é agora bem aceito que drogas seguras e eficazes devem ser produzidas. Há pelo menos 30 anos muitos esforços têm sido feitos para definir os mecanismos pelos quais a obesidade pode ser tratada (Ravussin e Bouchard, 2000).

Muitas drogas são usadas como moduladores da ingestão de alimentos, a maiorias pelos seus efeitos nas monoaminas, como noroepinefrina, serotonina e dopamina. Drogas serotoninérgicas como as fenfluraminas e dexfenfluraminas foram desenvolvidas e aprovadas para uso humano, até constatar que a dexfenfluramina sozinha ou em combinação estava associada com problemas valvulares, e então, foi retirada imediatamente de circulação. No mercado Americano há apenas duas drogas aprovadas para uso no tratamento de obesidade na atualidade, a sibutramina e o orlistat. A sibutramina é uma droga simpatomimética que aumenta a recaptação central de noroepinefrina, serotonina e em menor extensão de dopamina (Ravussin e Bouchard, 2000).

A sibutramina foi inicialmente avaliada nos anos de 1980, como um antidepressivo em potencial devido ao seu mecanismo de ação ser similar ao dos antidepressivos tricíclicos. Observando que no tratamento de pessoas com depressão, principalmente obesas, ocorria significativa redução da massa corporal. A partir destas observações passou-se a empregar a droga no tratamento da obesidade (Kelly, 1985). A sibutramina também aumenta a energia despendida.

Ela é um agente de ação central que inibe a recaptação de serotonina e noradrenalina liberada de neurônios hipotalâmicos.

O orlistat é um inibidor de lipase hepática e pode ser classificada como uma droga que altera o metabolismo, através da inibição gastro-intestinal da absorção de triglicérides. Na atualidade não há droga aprovada nos Estados Unidos da América cujo efeito é aumentar a termogênese, para tratamento da obesidade. Entretanto a cafeína e a efedrina têm apresentado resultados preliminares com efeito moderado na perda de peso (Ravussin e Bouchard, 2005).

O dinitrofenol foi a primeira droga termogênica sintética usada para tratar obesidade. Seu mecanismo de ação impede o acoplamento da fosforilação oxidativa para a geração de ATP. Nos anos de 1930, foi responsável pela morte de várias pessoas o que levou as autoridades a retirá-la rapidamente do mercado. Com a extração da Efedrina de uma planta Chinesa (*Ephedra sinica*) foi possível sintetizar, em 1933, a anfetamina, droga estimulante muito consumida por militares durante a Segunda Guerra Mundial, apesar de esta droga inibir a fome e a ingestão de alimentos ela provoca dependência química e é usada abusivamente. Na tentativa de produção de drogas menos agressivas foi sintetizado nos anos de 1960, a fentermina, dietilpropiona e mazindol. Todas estas três drogas têm mecanismo principal de ação na liberação e bloqueio da recaptação de noradrenalina em neurônios hipotalâmicos; apesar de ter baixo potencial de abuso estas drogas interferem no sono causando desagradável estado de estimulação. Ainda nos anos de 1960 foi desenvolvida a fenfluramina, e nos anos de 1980 a dexfenfluramina. A fenfluramina atua na liberação e inibição da recaptação de serotonina em neurônios pré-sinápticos dentro do núcleo paraventricular do hipotálamo. A dexfenfluramina (D-isômero) possui forte atividade liberadora de serotonina e inibidora de sua recaptação, enquanto o L-isômero possui forte atividade dopaminérgica. Estas drogas são relatadas por causar muitas reações adversas inclusive graves problemas cardíacos. Devido aos efeitos secundários elas foram retiradas do mercado em 1997.

Outras drogas agonista da serotonina avaliadas para tratamento da obesidade inclui os inibidores seletivos da recaptação: fluoxetina, fluvoxamina e sertralina. Estas drogas são freqüentemente usadas para tratamento de depressão, mas são relatadas por produzir perda de peso, porém se associadas com antidepressivos tricíclicos provocam ganho de peso. Um medicamento antiobesidade recentemente retirado do mercado nos USA foi o fenilpropanolamina esta droga é uma mistura racêmica de ésteres de noroefedrina e sua ação predominante é o estímulo de adrenoceptores epitalâmicos reduzindo o apetite e aumentando a termogênese. Foi

retirada do mercado por estar associada com acidente vascular cerebral (Ravussin e Bouchard, 2000).

Classificação dos Fármacos Anorexígenos:

Fármacos inibidores da absorção de nutrientes

- Orlistat ou tetrahidrolipostatina, é um inibidor enzimático seletivo da lipase pancreática;
- Fibras solúveis: goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), glucamanano (*Amorphophallus konjac*), (*Plantago psyllum*) ou (*Plantago ovata*), dão a sensação de saciedade e retarda o esvaziamento gástrico e a absorção de glicose.

Fármacos que reduzem o apetite e aumenta a saciedade

I - Fármacos modificadores da neurotransmissão de monoaminas

- Sibutramina (cloridrato de sibutramina), é um inibidor seletivo da recaptção de serotonina e da noroadrenalina com capacidade também de bloquear a recaptção de dopamina;
- Fentermina, potencializador da liberação e inibidor da recaptção de noroadrenalina;
- Mazindol, inibidor da recaptção de noradrenalina;
- Dietilpropiona (anfepramona), potencializador da liberação de noroadrenalina e serotonina;
- Benzfetamina, fenmetrazina e fendimetrazina, agonistas β_1 ;
- Fenfluramina e dexfenfluramina, potencializadoras da liberação e inibidoras da recaptção pré-sináptica de serotonina.

II - Fármacos modificadores seletivos da neurotransmissão de serotonina

- fluoxetina, paroxetina, fluvoxamina e sertralina, inibidores seletivos da recaptção de serotonina.

III - Fármacos anticonvulsivantes (antiepiléticos)

- valproato e gabapentina, promovem hiperfagia e a zonisamida e topiramato suprimem o apetite.

IV - Fármacos derivados de peptídeos gastrointestinais.

- Pramlintida análogo da amilina;
- PYY análogos do peptídeo tirosina-tirosina;

- análogos dos peptídeos similares ao glucagon (GLP1) como a exenatida e liraglutida.

V - Fármacos que atuam sobre o sistema endocanabinóide

- Rimonabant é um bloqueador seletivo do receptor CB1, o bloqueio dos receptores CB1 diminui o desejo por comida.

VI - Fármacos derivados de outros hormônios

- Transcrito Regulado por Anfetamina e Cocaína (CART) e a Pró-Opiomelanocortina (POMC) diminui a ingestão de alimento pela ativação dos receptores de melanocortina (MCR) 3 e 4;
- Leptina regula a ingestão calórica

VII. - Agentes modificadores do metabolismo da insulina e dos carboidratos

- Inibidores da proteína-tirosina fosfatase 1B, antagonistas do PPAR- γ , agonistas da somatostatina e a adiponectina;
- Metformina reduz a absorção intestinal de glicose.

VIII - Fármacos que estimulam o consumo energético basal

- agonistas seletivos β_3 , estimula a lipólise;
- homólogos das proteínas desacopladoras (UCP 2 e 3), estimula a dissipação de energia;
- efedrina e cafeína estimula o sistema simpático (α y β);
- Indanonas/indanoles, aminosteróis inibidores da lipase gastrointestinal (Ravussin e Bouchard, 2005).

A obesidade é uma desordem multifatorial que atinge proporção epidêmica e representa a maior preocupação na atualidade para as autoridades de saúde pública. A WHO estima que em 2015, 700 milhões de indivíduos adultos estarão obesos. A intervenção com tratamentos a base de drogas é uma alternativa para combater a crescente incidência da doença. Entretanto há relativamente poucas drogas anti-obesidade disponíveis. Internacionalmente somente 4 fármacos são aprovados: a fentermina, um anorexígeno estimulante de catecolamina; a sibutramina, inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina; o orlistat, inibidor da lipase e o rimonabant, antagonista do receptor CB-1. Três deles (fentermina, sibutramina e rimonabant) têm como alvo de ação o sistema hipotalâmico e um (Orlistat) a lipase pancreática e gástrica (Atkinson, 2008).

O “United States Food and Drug Administration” (FDA) aprovou anteriormente a comercialização do orlistat, da sibutramina e da fentermina, mas o rimonabant ainda aguarda

aprovação para sua comercialização. Outras drogas como: topiramato, diazoxida, dietilpropiona, naltrexona, sertralina, metformina, fendimetrazina e fluoxetina são usadas com limitado sucesso no tratamento de obesidade (Atkinson, 2008).

1.6 Fitoterápicos

Desde os tempos imemoriais, as pessoas utilizam os recursos animais e vegetais para sanar suas necessidades. Temperos, ervas, frutos, nozes, gomas, cogumelos, forrageiras, fibras usadas para construção de abrigo, roupas e utensílios, produtos de origem animal e vegetal para uso medicinal, cosmético e cultural; são exemplos desta dependência humana. Diariamente milhões de pessoas, grande parte, em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, dependem significativamente dos produtos de origem animal e vegetal para suas subsistências. Nos países considerados desenvolvidos também uma parcela da população recorre a estes recursos por questões culturais ou econômicas.

Dentre os usos, as plantas medicinais possuem um papel de destaque não somente pelo uso na medicina tradicional por muitas culturas, mas também por ser comercializada com “commodities” para mercados de todo o planeta (Hamilton, 2005). Nos países em desenvolvimento uma parcela significativa da população usa a medicina popular (folclórica) para sanar seus problemas de saúde. Dentre as práticas comuns incluem o uso de extrato de plantas contendo uma diversidade de moléculas, que normalmente, não se conhece os efeitos biológicos (Konan *et al.*, 2007).

Aproximadamente 2/3 das espécies de plantas superiores do planeta ocorre nas florestas tropicais da América do Sul, África, Ásia e Austrália (Pushpangadan e Nair, 2005).

O número de espécies de plantas, que são usadas com finalidades medicinais, por pessoas de distintas culturas no mundo, pode ser apenas estimado. A WHO estimou que nos anos de 1970 usavam 21.000 espécies de plantas medicinais; entretanto se levarmos em consideração a porcentagem de uso nos mais diversos países do globo e a diversidade de aproximadamente 300.000 espécies de plantas superiores (Fanerógamas) conhecidas é possível estimar que 35.000 – 70.000 são utilizadas para fins medicinais (Schippmann *et al.*, 2002; Hamilton, 2005).

Os produtos fitoterápicos tiveram aumento considerável de seu uso nos últimos tempos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a estimativa para o início da primeira década de século XXI, é que, somente o mercado europeu de produtos naturais, movimentou 500 bilhões

de Euros em vendas. Entre 1990 e 1997 o uso de medicamentos fitoterápicos entre cidadãos dos Estados Unidos da América aumentou em aproximadamente 400% (IARC, 2002).

Cada vez mais as pessoas dos países em desenvolvimento aumentam a dependência por plantas medicinais para seus cuidados primários da saúde. Em estimativa feita pela WHO afirmam que mais de 80% da população mundial acredita somente, ou na maioria das vezes, nos remédios da medicina tradicional para seus cuidados de saúde. Esta tendência não se justifica apenas pelo aumento demográfico, mas é também devido ao modismo da volta ao natural, aos produtos ambientalmente saudáveis (Hamilton, 2005).

Em geral a demanda por plantas medicinais e remédios a base de ervas e o seu renascimento em países desenvolvidos é motivado pelos seguintes fatores: aumento do custo dos medicamentos alopáticos, aumento dos cuidados preventivos, interesse individual, da comunidade e do governo em estimular o autocuidado com a saúde, interesse da comunidade e de governos em diminuir o desenvolvimento industrial baseado nos recursos da biodiversidade, aumento do sucesso na validação da segurança e eficácia de remédios à base de ervas, legislação melhorando o status da indústria de remédios à base de ervas, interesse renovado da indústria em isolar e usar produtos componentes de plantas, pesquisa de novas drogas e tratamento de doenças resistente às drogas existentes, estratégia de marketing de empresas que comercializam fitoterápicos (Hamilton, 2005).

O fato intrigante é que o aumento no consumo nem sempre é respaldado pela garantia da qualidade do produto. A alta incidência de casos de intoxicação relacionada ao uso de fitoterápicos demonstra que seu consumo não está isento de risco (IARC, 2002).

A quantidade e a qualidade dos dados de eficácia e segurança em medicina tradicional estão distantes dos critérios ideais para sustentar seu uso em todo o mundo. A razão para a carência de dados de pesquisa não é somente devido à falta de políticas de saúde pública, mas também, devido à falta de adequada e aceitável metodologia de pesquisa para avaliação dos produtos da medicina tradicional. Também deve ser lembrado que há muitos dados publicados e não publicados em vários países sobre medicina tradicional, que devem ser posteriormente avaliados quanto a sua segurança e eficácia para melhorar a qualidade da pesquisa.

A avaliação de produtos da TM (traditional medicine)/CAM (complementary and alternative medicine) como os remédios a base de ervas, bem como, a correta identificação da planta, e o isolamento de seus princípios ativos são muito difíceis. As propriedades das plantas

medicinais são influenciadas pelo período da coleta e área de origem, incluindo as condições ambientais; somando-se ao fato que uma simples planta medicinal pode conter centenas de constituintes naturais. Estabelecer qual constituinte é responsável pelo efeito pode ser uma atividade laboriosa e cara. De forma que, dado à popularidade do uso de plantas medicinais em todo o mundo e os limitados recursos é necessária ampla avaliação com urgência (WHO, 2002).

A escassez de estudo é revelada pela busca de artigos indexados sobre o tema. Durante o período de 1966-1996 apenas 0,4% dos artigos listados pelo MEDLINE abordavam o assunto medicina alternativa. Também o fato de apenas 3% dos 771 casos de efeitos adversos de drogas registrados pela WHO no início de 1997, envolver plantas medicinais, pode apontar para o baixo nível de monitoramento deste recurso, ao invés de indicar que os efeitos adversos das plantas medicinais são poucos (WHO, 2002).

A WHO prescreve as seguintes recomendações para melhorar a segurança, eficácia e qualidade de TM/CAM a nível regional e global: regulamentação e registro de medicamentos a base de plantas; monitoramento da segurança no consumo de fitoterápico ou outros TM/CAM, apoio para pesquisa clínica do uso de TM/CAM para problemas de saúde comumente tratados no país, padronização nacional, diretrizes técnicas e metodológicas para avaliação da segurança, eficácia e qualidade de TM/CAM, farmacopéia nacional e monografia de plantas medicinais; acesso ao conhecimento existente de TM/CAM pela troca de informações acuradas e grupo de estudo, apresentar os resultados de pesquisas sobre uso de TM/CAM para tratamento de doenças comuns, evidenciar, baseado na segurança, eficácia e qualidade de TM/CAM produtos e terapias (WHO, 2002).

Os produtos extraídos de plantas medicinais podem causar intoxicações semelhantes às observadas com as drogas sintéticas, e pesquisas sistemáticas são requeridas para suprir o vazio entre o conhecimento atual e o uso seguro dos medicamentos. Atualmente os fitoterápicos são muito usados em programas de redução de massa corporal e melhoria da condição física, sem o mínimo respaldo científico. Até recentemente poucos dados estavam disponíveis sobre estudos mutagênicos com esses produtos (Ernst, 2004; Rietjens *et al.*, 2005). Em 1992 na Bélgica, mulheres que participavam de um programa de redução de massa corporal, utilizando uma mistura de ervas orientais, apresentaram fibrose renal e houve um aumento significativo na prevalência de tumores do urotélio, da pelve renal, ureter e bexiga urinária (IARC, 2002).

Em um estudo realizado com 2695 pacientes admitidos no “Taiwan Department of Medicine” (República da China) durante 10 meses, verificou-se que 4% destes apresentavam problemas relacionados com drogas; e os fitoterápicos estão em terceiro lugar nas causas destas complicações clínicas. O uso de vegetais “*in natura*” foi responsável por 12% de todas as admissões observadas pelo programa de “Adverse Drug Reaction” em Taiwan (Ernst, 2004).

Espécies de plantas do gênero *Aristolochia* são responsáveis por nefropatias e câncer urotelial. Plantas contendo derivados de antraquinona (1- hidroxiantraquinona) induz adenocarcinomas intestinal em ratos. A planta *Rubia tinctorum* que contém: 1,3 dihidroxi-2-hidroxi metilantraquinona, causa discreto aumento de carcinoma hepatocelular, adenomas e carcinoma do córtex renal em ratos (IARC, 2002).

O alcalóide pirrolizidina, encontrado em uma grande variedade de plantas, dentre elas muitas são utilizadas na medicina popular (gênero *Senecio*), é capaz de induzir o desenvolvimento de câncer em roedores, nas condições laboratoriais (Prakash *et al.*, 1999). A ridellina, encontrada em *Senecio ridelli* e outras espécies de *Senecio*, incluindo *S. longilobus*, muito usadas em preparação de chá no sudoeste dos Estados Unidos da América, é capaz de induzir hemangiosarcoma hepático, adenomas brônquio-alveolar, carcinoma hepatocelular, e leucemia em células mononuclear de roedores (IARC, 2002).

O confrei, fitoterápico usado para preparação de chás, contém altos níveis de alcalóides pirrolizidínicos, e pode ser diretamente tóxico para seres humanos (Prakash *et al.*, 1999). Muitos alcalóides pirrolizidínicos são efetivamente carcinogênicos e mutagênicos. O consumo regular de chás de determinadas plantas podem aumentar o risco de câncer em humanos, principalmente se tomados sem orientações técnicas. Portanto, é preciso estar atento e acabar com a crença de que remédio natural pode não fazer bem, mas também não faz mal (Ferguson, 1999).

A pesquisa contemporânea de novas moléculas tem apostado no conhecimento da etnobotânica e da etnofarmacognosia. Estes conhecimentos estão sendo usados como guias para conduzir a descoberta de diferentes e, novas classes de compostos (Gurib-Fakim, 2006). Baseado no conhecimento da etnomedicina alguns fitoterápicos tem sido desenvolvidos, entre estes os relacionados à prevenção e tratamento de distúrbios psiquiátricos que constitui uma área em pleno crescimento (Costa *et al.*, 2004). Nas últimas duas décadas numerosas publicações têm descrito a importância que os produtos naturais representam no desenvolvimento de novos medicamentos ou fitoterápicos (Patwardhan, 2005). Conseqüentemente vários trabalhos também

são publicados assinalando o potencial toxicológico destes produtos (Aguilar-Santamaría *et al.*, 2007).

As plantas contribuem substancialmente com a medicina do ocidente pela disponibilização de ingrediente para fármacos, ou tendo papel central na descoberta de fármacos. Alguns fármacos de origem vegetal são extraídos diretamente de plantas, outros são obtidos pelas transformações de substâncias químicas encontradas entre elas; enquanto outros são hoje sintetizados de matéria inorgânica, mas têm sua origem histórica nas pesquisas de compostos ativos encontrados em plantas. Há indubitavelmente muito segredo no mundo das plantas. O número de espécies de plantas que fornecem ingredientes, para a produção de fármacos no ocidente, é relativamente pequeno. Em 1991, 121 fármacos de uso corrente nos Estados Unidos da América eram derivados de 95 espécies de plantas. Apesar do pequeno número de espécies produtoras de insumos, os fármacos derivados de plantas apresentam relevante importância devido ao grande número de pacientes tratados; 25% de todas as prescrições dispensadas por farmácias nos Estados Unidos da América entre 1959-1973 continham um ou mais derivado de plantas superiores. Em estudos mais recentes constataram que, dos 150 fármacos mais utilizados nos Estados Unidos da América em 1993, 57% de todas as prescrições continha pelo menos um composto principal ou derivado da diversidade biológica (Hamilton, 2005).

As plantas são importantes fontes de origem de fármacos. Da aspirina ao taxol a moderna indústria farmacêutica recorre à ampla diversidade de metabólitos secundários de vegetais para pesquisar novas drogas (Konan *et al.*, 2007). Podemos listar alguns fármacos derivados de plantas como:

- Analgésicos: Aspirina, Codeína, morfina;
- Cardiotônico: digitalina;
- Antimalárico:quinino;
- Anti-hipertensivo: reserpina;
- Melhoramento da memória: fisiostigmina;
- Relaxamento muscular: tubocurarina;
- Anticâncer: Vinblastina/Vincristina, Etoposido, Paclitaxel/Docetaxel, Topotecan/Irinotecan, Homoharringtonina, Flavopiridol, Combretastatinas;
- Anti-HIV: Prostatina, Calanolide B (Cragg,1999).

As plantas medicinais estão ganhando reconhecimento mais amplo nas recentes iniciativas para conservação e desenvolvimento a nível global. Isto, é evidenciado pela declaração da “World Health Organization” (WHO) em saúde e melhoria das comunidades, e baseada nas iniciativas de conservação por organizações internacionais como “World Bank, o International Development Research Centre” (IDRC), a “United Nations Development Programme” (UNDP), por exemplo. O esforço da WHO para reconhecer e promover o uso local de plantas medicinais pelo sistema de saúde, principalmente de países em desenvolvimento é proeminente. As terminologias relacionadas ao uso de plantas medicinais variam muito em diferentes culturas, países e comunidades (WHO, 2002).

A WHO usa o termo Medicina tradicional em seus documentos no sentido de diversas práticas de saúde, conhecimentos e convicções que incorporam plantas, animal e/ou mineral como medicamento, em terapias espirituais, técnicas manuais e exercícios aplicados isolados ou em combinação para manter o bem-estar, bem como para tratamento, diagnóstico ou prevenção de doenças (WHO, 2002).

Apesar das informações desconhecidas sobre o uso de plantas medicinais, é possível afirmar que entre comunidades locais o consumo permanece alto. O uso local de plantas medicinais é conhecido por diferentes termos, mas podem ser classificados nas três categorias seguintes (Hamilton, 2005):

- Sistema Tradicional de Medicina (TSM): possui um sistemático corpo de conhecimento codificado na forma de farmacopéia ou escrituras antigas (Ayurvedic, medicina Chinesa e Tibetana, Siddha, Unani etc.);
- Conhecimento Médico Tradicional ou medicina popular: transmitida por meios oral; é muitas vezes aprendida através de experimentações;
- Xamanística ou medicina espiritual: possui forte elemento religioso/espiritual e pode ser praticada, somente por indivíduos especializados chamados de Xamãs.

Em geral exceto para TSM o reconhecimento legal e político e suporte para a medicina popular e espiritual a nível global permanece fraco. A falta de suporte governamental associado à desvalorização do conhecimento popular, pelas comunidades locais e sociedade em geral, tem resultado na erosão do sistema de conhecimento das plantas medicinais (Hamilton, 2005).

A demanda por uma grande variedade de espécies está aumentando com o crescimento das necessidades humanas e ampliação da exploração comercial. Devido ao aumento desta demanda algumas espécies selvagens estão sendo vorazmente exploradas o que causa preocupação de extinção. Visando evitar este risco algumas agências como WHO, IUCN (International Union for Conservation of Nature), WWF (World Wildlife Fund) estão recomendando o cultivo destas espécies para fins comerciais. Este cultivo também pode ter impacto conservacionista. A produção de plantas medicinais através de cultivo pode reduzir a extensão em que as plantas selvagens são colhidas, mas também pode levar a degradação ambiental e perda da diversidade genética, bem como, a falta de incentivos para conservar as populações selvagens (Hamilton, 2005).

Acredita-se que uma sociedade é sustentável quando, as condições humanas e a condição do ecossistema, são satisfatoriamente melhoradas. Para isso ocorrer há necessidade de ação coordenada de conservação baseada em estratégia *in situ* e *ex situ*; inclusão da comunidade e desenvolvimento de programas e políticas, necessidade de melhores informações sobre o comércio de plantas medicinais, estabelecimento de sistema para inventariar e monitorar o status de estoque de plantas medicinais, desenvolvimento de prática de coleta sustentável, encorajamento do desenvolvimento de micro-empresendimentos por comunidades indígena ou rural, a proteção dos recursos naturais e direito à propriedade intelectual. Devido ao fato de várias espécies de plantas serem usadas para fins medicinais, à conservação delas representa de algumas formas a conservação das plantas como um todo (Hamilton, 2005).

Os medicamentos a base de plantas estão cada vez mais na moda em países ricos, a comercialização destes produtos tem crescido de 10-20% ao ano na Europa e América do Norte, nos anos recentes. Em adição há muitos produtos botânicos vendidos como alimentos saudáveis, suplemento alimentar, chás e, para vários outros propósitos relacionados à saúde e cuidados pessoais. É de valor imprescindível o uso de plantas medicinais para o sustento do homem. Elas são fundamentais para sua saúde, mas apesar de todos no planeta dependerem dos recursos vegetais são os mais pobres que são tipicamente dependentes das plantas medicinais, dos medicamentos obtidos delas e dos rendimentos produzidos pelo seu comércio (Hamilton, 2005).

Somente 15% de drogas alopáticas são consumidas em países em desenvolvimento, e a maior porção é obtida por pessoas de condição financeira confortável. Os pobres têm poucas alternativas que não seja o uso de plantas medicinais para tratamento de seus males. Em países

em desenvolvimento tanto os moradores das áreas rurais quanto as de áreas urbanas confiam no poder curativo das plantas medicinais. Nas áreas rurais muitas pessoas utilizam-se das plantas medicinais coletadas próximas de suas casas, enquanto os moradores da cidade dependem em muitos locais de plantas secas transportadas das áreas rurais. Há muitas espécies de plantas medicinais que estão listadas como ameaçadas de extinção e outras que não estão, mas podem estar sofrendo erosão genética agora ou, sofrerá em um futuro próximo. Isto porque muitas espécies estão sendo retiradas e as populações periféricas estão sendo destruídas com a redução da qualidade e extensão de muitos habitat naturais. Entretanto a erosão genética entre plantas selvagens é muito pobremente documentada (Hamilton, 2005).

O significado especial das plantas medicinais relaciona-se ao valor que ela tem para as pessoas. Este valor refere-se à contribuição que as plantas medicinais podem ter para os cuidados com a saúde, rendimento financeiro, identidade cultural e segurança de sustento. Acreditam que estas contribuições vão ser suficientemente importantes para focar que as plantas medicinais têm o potencial para contribuir muito mais, em termos de conservação e desenvolvimento sustentável (Hamilton, 2005).

1.7 Perigo Invisível nos “Produtos Naturais”

Diante do alarmante problema de saúde pública que representa a obesidade, surge outro problema acessório que é o contrabando, falsificação e comercialização sem respaldo médico dos fármacos para obesidade. O apelo por um corpo, estabelecido como ideal pelo mercado, tornam muitas pessoas escravas dos esforços para atingi-lo. Neste desespero muitos recorrem, às vezes desnecessariamente ou por comodidade, ao auxílio de tratamento medicamentoso. O mercado aproveitando desta desesperada fraqueza humana e visando obter benefícios financeiros disponibiliza de forma regular e irregular as mais diversas soluções. Dentre os atrativos estão os ditos produtos naturais emagrecedores. Muitos destes produtos de natural só têm o nome, pois estão presentes em suas composições um ou mais princípio alopático (Almeida *et al* 2000). Desta forma, os indivíduos são ludibriados e expostos a riscos de agravo à saúde.

Vigilante a estas irregularidades o (FDA) alerta a população Americana para não consumir determinados produtos de origem brasileira denominados fitoterápicos ou suplementos a base de ervas, para perda de peso. Segundo constatação das autoridades do FDA muitos destes produtos representam sérios riscos a saúde do consumidor por conterem substâncias de uso

controlado e algumas de uso proibido nos Estados Unidos da América. O FDA alertou os consumidores para não adquirirem estes produtos, mas o controle é muito difícil, pois a comercialização em grande parte é feita pela Internet. Eles listaram 72 produtos que apresentam estas adulterações e verificaram que os princípios ativos que estão nestas fórmulas, não identificados, são:

- femproporex: fármaco de uso controlado, proibido nos Estado Unidos da América;
- fluoxetina : antidepressivo vendido somente com prescrição médica;
- bumetanida: potente diurético vendido somente com prescrição médica;
- furosemida: potente diurético vendido somente com prescrição médica
- rimonabant: droga não aprovada para venda nos Estados Unidos da América;
- cetilistat: droga para obesidade em fase experimental, não aprovada para venda nos Estados Unidos da América,
- fenitoína: medicamento para tratamento de apoplexia, vendido somente com prescrição médica;
- fenolftaleína:solução usada em experimentos químicos, suspeito de causar câncer (FDA, 2006).

Desta forma os indivíduos devem estar vigilantes e cautelosos diante destes apelos milagrosos para a perda de peso; o caminho seguro, caso haja necessidade, é procurar o serviço médico especializado e nos casos de descontentamentos sugeridos pelos apelos condicionantes da mídia é melhor procurar um serviço de psicologia do que expor sua saúde a estas ameaças invisíveis.

1.8 Fitoterápicos Objetos Deste Estudo

***Echinodoros grandiflorus* (Chamisso and Schlechtendal) Michelli (Alismataceae)**

E. grandiflorus Mitch. é uma planta da família Alismataceae conhecida popularmente como chapéu-de-couro, chá-mineiro, erva-de-brejo, Chá-de-campanha, congonha-do-brejo, aguapé, (Cardoso *et al.*, 2003). Encontra-se distribuída geograficamente entre o Sul do México, América Central, Colômbia, Venezuela e Brasil. No Brasil encontra-se no Acre, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Tanaka,

2000; de Souza *et al.*, 2004). Alismataceae é uma família de monocotiledôneas primitiva constituída de 11 gêneros e 75 espécies. Ocorrem em regiões tropicais, subtropicais e subtemperadas tanto no ocidente quanto no oriente (Crow, 2003).

São plantas aquáticas ou semi-aquáticas. O gênero *Echinodorus* neotrópicos, nativo na América tropical é formado por 26 espécies que ocorrem do norte dos Estados Unidos até a Patagônia (Haynes e Nielsen, 1994). No Brasil *E. grandiflorus* e *E. Macrophyllus* são popularmente conhecidas como Chapéu-de-couro. (Manns e Hartmann, 1993; Tanaka *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000a; Kobayashi *et al.*, 2000b).

É uma planta aquática e semi-aquática, encontrada principalmente em canais de drenagem, margem de lagoas e baixadas pantanosas em geral (Tanaka, 2000); perene, herbácea, medindo de 1,5 a 2 metros de altura, com reprodução principalmente por sementes, ocorrendo numa grande faixa do Brasil, principalmente na região litorânea. A sua sinonímia científica inclui: *Alisma grandiflorum*, Chamet Schl., *Echinodorus floribundus*, Seub., *Echinodorus muricatus* Griseb, *Echinodorus muricatus*, Wood et Schevy, *Echinodorus probeacens* Mart. Ocasionalmente é cultivada como ornamental, mas seu uso folclórico como fitoterápico inclui como depurativo, tônico, diurético, emoliente, e por atuar contra reumatismo, sífilis, artrite, doença do fígado e da pele, ácido úrico, arteriosclerose, antiinflamatório e até mesmo contra picada de cobra. Também é constituinte de uma bebida popular brasileira denominada Mineirinho®. As atividades analgésicas, antiinflamatória e diurética do infuso das folhas do chapéu-de-couro foi ensaiada em animais de laboratório. O extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus* apresentou máxima atividade antinociceptiva e antiinflamatória na concentração de 5% (Tanaka, 2000; Cardoso *et al.*, 2003).

O perfil químico das espécies de *Echinodorus* é representado basicamente por terpenóides (Manns e Hartmann, 1993; Tanaka *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000a; Kobayashi *et al.*, 2000b; Lopes *et al.*, 2000). Tanaka (2000), estudando a fitoquímica de *E. grandiflorus* isolou diterpenos; grupo de substâncias extensivamente estudadas devido a sua propriedade antimicrobiana e antineoplásica (Tanaka, 2000).

Análise por cromatografia com fase gasosa e cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de óleos essenciais obtidos de folhas de *E. grandiflorus* (“Chapéu-de-couro”) em duas diferentes populações (folhas grandes e folhas pequenas), coletadas mensalmente entre setembro de 1998 e dezembro de 1999, revelou 17 componentes. O fitol foi o

constituente majoritário em ambas as populações. Os principais representantes sesquiterpênicos foram (E)-cariofileno, α -humuleno e (E)-nerolidol (Pimenta, 2006). Várias substâncias como flavonóides, diterpenos, triterpenos e esteróides já foram isolados de plantas do gênero *Echinodorus* (Costa *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 2000).

O extrato aquoso e o etanólico de folhas de *E. grandiflorus* apresentam potente efeito vasodilatador em estudos com coelhos, talvez este seja o motivo pelo qual muitos indivíduos usam a folha como anti-hipertensivo (Tibiriçá *et al.*, 2007; Lessa *et al.*, 2008). Duarte *et al.* (2002), verificou que *E. grandiflorus*, apresenta atividade biológica em bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Na triagem fitoquímica do Chapéu-de-couro (*E. grandiflorus* (Cham. & Schl.) Micheli (Alismataceae) utilizando folhas obteve-se os seguintes resultados: reação moderada (++) para esteróides; saponinas; polifenóis e flavonóides).

***Cordia ecalyculata* Vell.**

A família Boraginaceae é conhecida taxonomicamente pela presença de naftoquinonas e benzoquinonas (Falkenberg, 2001). Esta família possui cerca de 100 gêneros e 2000 espécies distribuídas por todo o mundo, especialmente em regiões tropicais, sendo que o gênero *Cordia* L. é o melhor representado no Brasil (Akisue *et al.*, 1983.)

Cordia salicifolia Cham. sin. *Cordia ecalyculata* Vell., é uma planta da família Borraginaceae conhecida popularmente como: porangaba, chá-de-bugre, cafezinho, café-do-mato, bugrinho, Chá-de-negro-mina, Laranjeirado mato, Claraíba, Café de bugre, chá-de-frade, louro salgueiro, café-do-diabo, chá-de-soldado, laranjinha-do-mato, poranga, louro mole. Na Argentina é conhecida como Araticú-guassú (Cruz, 1995; Dias, 2004). Pode ser encontrada em Minas Gerais, Goiás, Bahia, Rio Grande do Sul, Acre, na Argentina e Paraguai (Smith, 1970; Saito e Oliveira, 1986; Lorenzi, 1992; Correia, 1984; Mors *et al.*, 2000). O termo “ecalyculata” provém da característica do cálice decíduo do fruto (Smith, 1970).

C. ecalyculata é uma árvore, arvoreta ou arbusto, que mede de 3 a 20 metros de altura (Smith, 1970; Saito, 1984) ou segundo Correia (1984), até 6 metros; ou de acordo com Lorenzi (1992) de 8 a 12 metros de altura. O tronco possui 20 cm de diâmetro (Correia, 1984), ou de 30 a 40 cm diâmetro (Saito, 1984; Lorenzi, 1992). Este é aproximadamente reto, diminuindo o diâmetro, gradativamente e aparecendo as ramificações nos exemplares mais desenvolvidos á

altura de 2,5 a 3 m do solo. Sua coloração varia do pardo acinzentado ao pardo avermelhado (Saito, 1984). A casca apresenta-se pardo-vermelho-escura, pouco espessa e com numerosas fendas pequenas (Correia, 1984); observada de perto apresenta-se com aspecto verrucoso devido ao grande número de lenticelas de aspecto globoso e um tanto saliente (Saito, 1984). Pode-se perceber, ainda, a presença de estrias que em conjunto assumem aspecto reticulado (Saito, 1984).

Os ramos mais desenvolvidos, de aproximadamente 20 cm de diâmetro possuem em secção transversal coloração amarelo-palha e que escurece um pouco em contato com o ar. As secções transversais deixam ver anéis de crescimento concêntricos. Os ramos jovens são finamente estriados no sentido longitudinal, possuem coloração amarronzada e lenticelas como aquelas mencionadas para o tronco. As pontas dos ramos são lisas e de coloração verde (Saito, 1984).

As folhas são lanceoladas ou oblongo-lanceoladas, agudas ou acuminadas pela base e pelo ápice, medindo de 8- 9 cm, chegando até 12 cm de comprimento (Smith, 1970; Saito, 1984). Segundo Lorenzi (1992) medem de 8-14 cm de comprimento, 2-3 cm de largura. São subcoriáceas (Smith, 1970) ou membranáceas (Lorenzi, 1992) inteiras, glabras, luzidas (Smith, 1970; Correia, 1984; Saito, 1984; Lorenzi, 1992). São verde-escuras na página superior e um pouco ásperas na página inferior (Correia, 1984) possuem enervação do tipo penínervia, sendo a nervura mediana bem evidente, saliente na face dorsal e na face ventral (Saito, 1984). Correia (1984), descreve *C. ecalyculata* sob a sinonímia de *C. salicifolia* e nome popular de café-do-mato, pois produz um fruto vermelho que lembra o do café. Nativa do Brasil, mas pode ser encontrada em área de floresta tropical da Argentina e Paraguai. O chá é utilizado como diurético e nos regimes de emagrecimento (Hayashi *et al.*, 1990; Cruz, 1995; Mors *et al.*, 2000; Barroso *et al.*, 2002), para tratamento de tosse, como cicatrizante de feridas (Saito, 1984; Mors *et al.*, 2000) estimulante do coração e tônico (Hayashi *et al.*, 1990; Barroso *et al.*, 2002). Correia (1984) atribuiu propriedades sudoríferas, depurativas e anti-reumáticas, para *C. ecalyculata*, além de citar seu uso contra febre amarela e gripe.

Sua madeira que pode ser usada para confecções de móveis e carpintaria e as árvores podem ser aproveitadas para arborização de ruas, sendo espécie ornamental e seus frutos suculentos são consumidos por algumas espécies da fauna (Correia, 1984, Lorenzi, 1992).

Hayashi e colaboradores (1990) estudando o extrato hidroalcoólico a 70% dos órgãos aéreos de *C. ecalyculata*, coletada no Paraguai, constataram efeito *in vitro* significativo na inibição do vírus *Herpes simplex* tipo I, sugerindo efetiva atividade antiherpética. Sua utilização

medicinal é antiga, principalmente na forma de chá como diurético, estimulador da circulação, cardiotônico, na diminuição de edema, diminuição do apetite (no tratamento de obesidade), além de auxiliar na diminuição dos níveis de colesterol total e triglicerídeos prevenindo a deposição de gorduras nas artérias e ainda ação antibacteriana contra *Helicobacter pylori* (Cardozo *et al.*, 2008). O extrato desta planta é comercializado no Brasil como diurético, redutor de apetite, cardiotônico, estimulante da circulação e no combate à celulite (Cruz, 1995; Dias, 2004).

Apesar de extensamente comercializada, a ponto de ser exportada para outros países, não se encontram na literatura dados comprovando efetivamente as suas atividades, principalmente as relacionadas com a ação hipolipidêmica, para a qual é bastante utilizada popularmente. Cardozo e colaboradores (2008) administraram o extrato de *Cordia salicifolia* (100 mg/kg/dia) em camundongos com dieta normal e em camundongos submetidos à dieta hiperlipidêmica (15 dias) e verificaram que houve redução nos níveis séricos de colesterol total, tanto no grupo que recebeu dieta normal mais o extrato, quanto no grupo com dieta hiperlipidêmica mais o extrato. Também verificaram significativa redução nos níveis séricos de triglicerídeos nos animais que receberam dieta hiperlipidêmica mais extrato, quando comparados aos camundongos que receberam dieta hiperlipidêmica mais água (Cardozo *et al.*, 2008).

Menghini *et al.* (2008), estudando a fitoquímica de extrato de folhas de *C. salicifolia* detectou espatulenol, sitosterol, hidrocarbonetos de cadeias longas (C₁₀ – C₃₀), álcoois de cadeias longas (C₁₂ – C₂₈) e ácidos graxos. Já em outro estudo Saito, (1984) detectou a presença de flavonóides, saponinas, taninos e mucilagens na droga vegetal. Dos extratos fluidos (utilizando como líquido extrator etanol a 70%) foram isoladas as seguintes substâncias: cloreto de potássio, hidróxi-éster-alifático, tritriacontano, alantoína e ácido alantóico. Posteriormente Saito *et al.*, (1985), verificaram a presença de alantoína no extrato etanólico e tritriacontano no extrato hexânico de *C. eucalyculata* Vell. enquanto Dias (2004), verificou que o extrato é rico em cafeína. No estudo feito por Cardozo *et al.* (2008), reforçaram que *C. eucalyculata* contém saponinas, alcalóides, heterosídeos cardiotônicos, compostos fenólicos, flavonóides, cumarinas, taninos e quinonóides.

1.9 Ensaio de Genotoxicidade

Testes genotóxicos podem ser definidos como testes *in vivo* ou *in vitro*, dimensionados para detectarem compostos que induzem danos genéticos por distintos mecanismos. Estes testes

têm o potencial de avaliar riscos de danos ou mesmo a fixação de danos no DNA. Compostos que são positivos nestes testes apresentam potencial para carcinogenicidade e/ou mutagenicidade em humanos (ICH, 2008).

Os métodos citogenéticos são também comumente usados para monitorar seres humanos expostos a potenciais fatores mutagênicos/carcinogênicos. Resultados positivos podem ser indicador de risco genotóxico (Karahalil *et al.*, 2005). Segundo Matter e Tsuchimoto (1980), em testes de mutagenicidade, para avaliar drogas farmacêuticas, é aconselhável, sempre que possível, o uso de sistema de mamíferos *in vivo*, nos quais as propriedades farmacêuticas das drogas são mais ou menos similares às aquelas observadas no ser humano.

Os linfócitos de sangue periférico humano, sangue periférico e tecido hematopoiético (medula óssea) de camundongo são usados para monitoramento ambiental de indutores de danos genéticos, por uma variedade de métodos: Teste do Micronúcleo, Aberrações Cromossômicas, Trocas entre Cromátides Irmãs, Ensaio Cometa (Single-Cell Gel Electrophoresis - SCGE). Os linfócitos humanos podem ser usados para estudos de genotoxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O sangue pode ser cultivado e incubado com substâncias oxidantes ou carcinogênicas e avaliado posteriormente os danos no DNA (Chuang e Hu, 2004).

Na atualidade, para registrar um medicamento são necessários estudos refinados, que avaliem seu potencial genotóxico, devido à correlação positiva entre potencial genotóxico e carcinogenicidade. Como há muitas divergências nos resultados dos diferentes testes as organizações fiscalizadoras visando amenizar os erros, recomenda a realização de uma bateria de testes para avaliar o potencial de risco de uma substância, pois nenhum teste genotóxico isolado será capaz de detectar todos os mecanismos genotóxicos relevantes na tumorigênese.

Uma bateria de teste padrão possui as seguintes características:

- a) avaliação de mutagenicidade pelo teste de mutação reversa em bactéria;
- b) avaliação da genotoxicidade em células de mamíferos *in vitro* e/ou *in vivo*.

Os testes de mutação reversa detectam importantes mudanças genéticas e possui boa sensibilidade para avaliar substâncias genotóxicas e carcinogênicas para roedores e humanos. Teste *in vitro* como ensaio de Aberração Cromossômica, Teste do Micronúcleo e ensaio de mutação gênica em células de linfomas de camundongos (L5178Y) são apropriados e de igual eficácia para o uso na bateria de teste. Os testes *in vivo*, são muito significantes, na avaliação do

potencial de risco de uma substância, pois permitem avaliar parâmetros como distribuição, absorção, metabolismo e excreção que podem influenciar a ação genotóxica de determinados compostos ou mesmo de seus metabólitos. Dentre os testes *in vivo* mais usados, estão os Testes de Micronúcleo em sangue periférico e tecido medular de roedores e Aberração Cromossômica em metáfase de células medulares de roedores (ICH, 2008).

A bateria de teste sugerida não impossibilita o uso de outros testes genotóxicos. Testes alternativos, vias diferentes e espécies diferentes, muitas vezes, são necessários para a melhor elucidação dos mecanismos de ação de uma substância. Os testes *in vivo* comumente realizado em sangue, tecido medular e fígado, às vezes, são incapazes de detectar efeitos de determinados compostos. Compostos cuja toxicinética ou farmacocinética, indicam que, eles não são absorvidos sistemicamente e, no entanto não podem ser avaliados em determinados tecidos alvos. Diante desta dificuldade em alguns casos a avaliação só é possível *in vitro* (ICH, 2008).

2. OBJETIVOS

- ♣ Avaliar se os fármacos anorexígenos sibutramina, femproporex e dietilpropiona possuem potencial genotóxico e/ou citotóxico;
- ♣ Avaliar se os extratos hidroalcoólicos de *Cordia ecalyculata* e de *Echinodorus grandiflorus* possuem potencial genotóxico e/ou citotóxico; e ainda se são eficazes no tratamento da obesidade.
- ♣ Verificar se, o equipamento de eletroforese específico para realização do Ensaio Cometa, que desenvolvemos em nosso laboratório, apresenta desempenho similar ao equipamento convencional comercializado para este fim.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação dos possíveis efeitos genotóxico e citotóxico de fármacos é freqüentemente realizada utilizando-se testes de curta duração, precisos e aceitos pelas agências fiscalizadoras/reguladoras que autorizam o uso de substâncias químicas em todo o mundo (Krishna e Hayashi, 2000). O Teste do Micronúcleo permite-nos verificar efeitos clastogênicos e aneugênicos e o Ensaio Cometa permite-nos verificar quebras entre fita simples ou dupla de DNA. O efeito citotóxico foi verificado comparando a relação entre PCE (eritrócitos policromáticos) e NCE (eritrócitos normocromáticos) em medula óssea de camundongos, ou pelo de teste de viabilidade celular *in vitro*. Como modelo experimental para o estudo *in vivo* foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), uma vez que a genotoxicidade e/ou carcinogenicidade em roedores representa aumento do risco de carcinogenicidade em humanos e são adotados como padrão pelas agências regulatórias em vários países (Snyder e Green, 2001; Vijayalaxmi *et al.*, 2006). Para os experimentos *in vitro* foram utilizadas células do ovário de hamster Chinês (CHO), fibroblasto (V79) e linfócitos humanos. Durante a condução dos experimentos seguiram-se todas as recomendações pertinentes ao uso de animais experimentais e boas práticas laboratoriais.

3.1 Substâncias Químicas

Hidrocloreto de Sibutramina

Sinônimos: Sibutramina, cloridrato de sibutramina

Nome químico: (±)- 1-(p-clorofenil)- α -isobutil-N,N-dimetilciclobutanometilamina hidrocloreto monohidratado

Fórmula molecular: C₁₇H₂₆ClN,HCL,H₂O (**Figura 1**)

Registro CAS: 106650-56-0 (sibutramina); 84485-00-7 (hidrocloreto de sibutramina anidro); 125494-59-9 (hidrocloreto de sibutramina monohidratado) (Martindale, 1996)

Lote IF076506*2, Deg Importadora de Produtos Químicos Ltda. São Paulo – SP - Brazil.

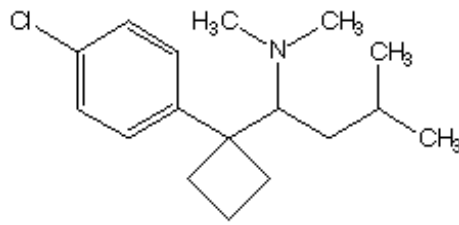


Figura 1: Estrutura molecular da sibutramina.

A Sibutramina (Reductil,[®] Milical,[®] Satón,[®] Atenix,[®] Mesura,[®] Ipogras,[®] Meridia[®]), foi introduzida nos Estados Unidos da América em fevereiro de 1998, após aprovação do FDA em novembro de 1997. Foi descoberta e é comercializada pela Knoll Pharmaceuticals, uma subsidiária da Abbott (Luque e Rey, 2002). A sibutramina foi inicialmente avaliada nos anos de 1980 como um antidepressivo em potencial devido ao seu mecanismo de ação ser similar ao dos antidepressivos tricíclicos. Foi observado que no tratamento de pessoas com depressão, principalmente obesas, ocorria significativa redução da massa corporal. A partir destas observações passou-se a empregar a droga no tratamento da obesidade (Kelly, 1985).

A sibutramina é uma β -fenetilamina que atua inibindo a recaptação da serotonina e norepinefrina. Ela atenua a função pré e pós-sináptica do adrenoceptor α -2 reduzindo o apetite por diminuição da estimulação do α -2. A sibutramina é metabolizada pelo fígado pelo citocromo p450 (III A4) nos metabólitos farmacologicamente ativos mono e di dimetilmetabólitos M1 e M2. Ambos são posteriormente inativados por hidroxilação e conjugação em M5 e M6 (Behar, 2002).

Femproporex

Sinônimos: Antiobes retard[®], Dandi[®], Degadil[®], Delgafen[®], Desobesi[®], Diafanor[®], Dichel[®], Drenur[®], Falagan[®], Fenisec[®], Fenorex[®], Gacilin[®], Grasmin[®], Lebil[®], Lianeal[®], Liofisan[®], Lipenan[®], Lipese[®], Lipofem[®], Lipoflex[®], Lipogen[®], Lipolin[®], Lipomax[®], Lipostil[®], Nilipoid[®], Perhoxen[®], Perphoxene[®], Persex R[®], Proporex[®], Solvolip[®], Suralgon[®], Tegisec[®], (Musshoff, 2000)

Nome químico: (\pm)-3-(α -Methylphenethylamino) propionitrilo hidrocloreto; Metil - 1 fenil - 2 etilamino - 3 propionitrila; N-2- Cianoetilanfetamina

Fórmula molecular: C₁₂H₁₆N₂.HCl (**Figura 2**)

Registro CAS: 15686-61-0

Lote 7CG5010, Genix Indústria Farmacêutica Ltda., Anápolis – GO - Brazil

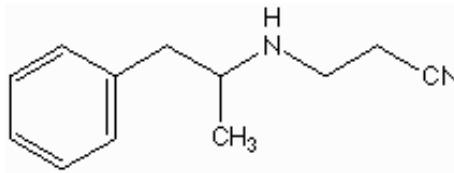


Figura 2: Estrutura molecular do femproporex.

O femproporex (sinapet,[®] salcal,[®] desobesi-M[®], lipomax A[®], Inobesin[®]) é um fármaco anorexígeno sintetizado a partir de anfetamina com o propósito de produzir apenas inibição central do apetite sem os efeitos prejudiciais de seus precursores (Behar, 2002; Mariz, 2004). É utilizado para tratamento de obesidade moderada e severa. Aproximadamente 3 horas após a ingestão do fármaco 5 - 9% é eliminado intacto na urina pelo sistema excretor; 34 – 56% é metabolizado via clivagem da ligação nitrogênio-cianoetil (**Figura 3**) formando o metabólito anfetamina (Musshoff, 2000).

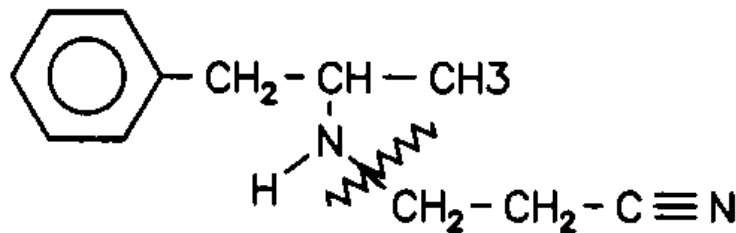


Figura 3: Ponto de clivagem do femproporex para liberação de anfetamina.

Dietilpropiona

Sinônimo: Cloridrato de dietilpropiona (**Figura 4**)

Nome químico: 2-(Diethylamino)-1-fenil-1-propanono cloreto,

Registro CAS:134-80-5

Obtida comercialmente na FARMODERM, Ribeirão Preto ,SP, Brasil.

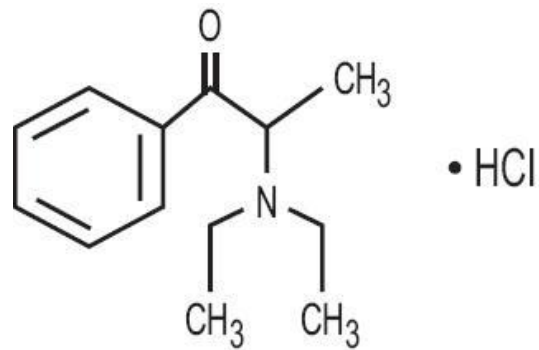


Figura 4: Estrutura molecular do cloridrato de dietilpropiona.

A dietilpropiona é também conhecida como anfepramona e possui efeito fisiológico semelhante ao da anfetamina, aumenta a liberação de norepinefrina e dopamina e inibe a recaptação destes neurotransmissores. Este fármaco também estimula em menor magnitude a liberação de serotonina (Garcia-Mijares, Bernardes e Silva, 2009).

Doxorrubicina (DXR)

Sinônimos: Doxolem®: Cloridrato de doxorrubicina (**Figura 5**)

Registro CAS:23214-92-8 e 25316-40-9

Eurofarma Laboratórios Ltda, Campo Belo – SP, Brazil e Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A , Pindamonhangaba – SP, Brazil.

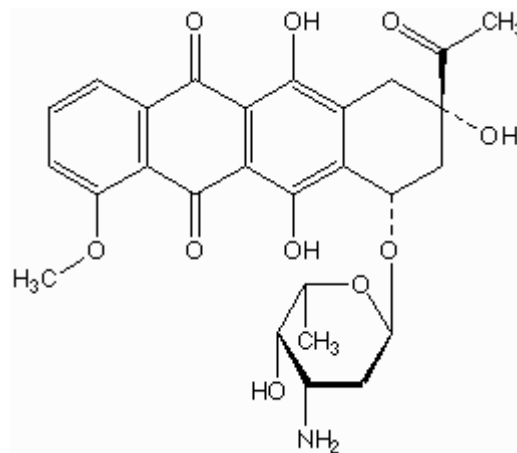


Figura 5: Estrutura molecular da doxorrubicina.

A doxorubicina é um antibiótico da família das antraciclina utilizado para tratamento de neoplasias malignas. Seu uso em ensaios para mutagênese e antimutagênese deve-se a sua capacidade de provocar danos ao DNA e aos cromossomos (Antunes e Takahashi, 1999; Quiles *et al.*, 2002).

Os mecanismos propostos para a ação citotóxica ou citostática da doxorubicina são: intercalação na fita de DNA e como consequência a inibição da síntese de macromoléculas; formação de radicais livres o que provoca danos no DNA, peroxidação lipídica, ligação no DNA e alquilação; DNA “cross-linking”; interferência no desnovelamento do DNA ou na separação das fitas, interferência na atividade da helicase; ação direta na membrana celular; inibição da topoisomerase II; indução de morte celular por apoptose (Gewirtz, 1999).

Citocalasina B

A citocalasina B (C₂₉H₃₇NO₅ - Sigma), CAS: 14930-92-2 foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma), CAS:67-68-5) a fim de obter uma solução de uso na concentração de 1,0 µg/mL. Esta solução é mantida ao abrigo da luz em refrigeração a 4°C até o momento do uso na concentração final de 5,0 µg/mL de meio de cultura.

3.2 Plantas

As drogas vegetais foram adquiridas em estabelecimentos comerciais especializados nestes produtos e devidamente autorizados a comercializá-los.

Nome Científico: *Echinodorus grandiflorus* (Cham. &Schltdl.) Micheli.

Parte utilizada: Folha

País de origem: Brasil

Secagem: estufa

Família: Alimastaceae

Lot nº: CHPCP01/0107

Análise de princípios ativos: Teste positivo para flavonóides, esteróides, saponinas, polifenóis (Manns e Hartmann, 1993; Duarte *et al.*, 2002).

A droga vegetal (folhas moídas) foi adquirida na Santos Flora Comércio de Ervas Ltda. São Paulo – SP, Brazil.

Nome Científico: *Cordia ecalyculata* Vell. ou *Cordia Salicifolia* Cham.

Parte utilizada: Folhas

País de Origem: Brasil

Secagem: estufa

Família: Boraginaceae

Lot nº: 164-F/05

Fitoquímica do extrato hidroetanólico: saponinas, antocianos, gomas e mucilagem, sais minerais, flavonóides, amido, taninos, aminogrupos, ácidos fixos, esteróides.

A droga vegetal (folhas moídas) foi adquirida na Hubert Comércio de Produtos Alimentícios Ltda.– São José dos Pinhais- PR, Brazil

3.3 Preparo do Extrato Hidroetanólico

Um quilograma de cada droga vegetal (*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli. and *Cordia ecalyculata* Vel), secas e pulverizadas, foram submetidos à maceração e extração em um percolador de aço usando solução de etanol-água (7:3) pelo período de 48 horas (procedimento repetido 3 vezes) a temperatura ambiente. Em seguida os extratos obtidos foram filtrados, em papel de filtro, e concentrados sobre pressão reduzida em rotaevaporador a 35-40°C para posteriormente serem liofilizados para obtenção dos extratos hidroalcolicos com rendimento de 15% e 17%, respectivamente para *Echinodorus grandiflorus* e *Cordia ecalyculata*. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar e ao abrigo da luz.

3.4 Protocolo de Tratamento dos Camundongos

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil aprovou os procedimentos usados neste estudo (Protocolo nº032/2006, anexo E). Camundongos Swiss machos com 4 a 6 semanas de vida foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo e acomodados individualmente em caixas de polipropileno vedadas com grades metálicas. Os animais foram condicionados em sala com temperatura de 22 ± 2 °C, 55 ± 10 % de umidade com ciclo de luminosidade e escuridão de 12 horas. Eles foram alimentados com ração comercial específica, NUVILAB CR1 (Colombo PR, Brasil) e receberam água *ad libitum*. Permaneceram nestas condições por 5 dias para aclimação e em seguida foram alocados para os tratamentos.

3.4.1 Tratamento dos Camundongos com femproporex ou sibutramina

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos com dois animais machos cada. O grupo que forma o controle negativo recebeu água destilada (10ml/kg/m.c), o controle positivo recebeu doxorrubicina (5 mg/kg/m.c), enquanto outros três grupos receberam as diferentes concentrações de femproporex e os três grupos restantes receberam as três concentrações de sibutramina. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 24 horas após a administração via intraperitoneal dos tratamentos. Posteriormente quatro novos grupos foram avaliados, um grupo controle negativo (água destilada 10mL/kg m.c), um controle positivo (doxorrubicina 5 mg/kg/m.c), femproporex (40 mg/kg/mc) e sibutramina (40 mg/kg/mc). Neste estudo os animais foram sacrificados 48 horas após os tratamentos. As doses de 10, 20 e 40 mg/kg m.c de sibutramina e femproporex utilizadas neste estudo foram selecionadas após estudos preliminares. O resultado final das investigações resulta dos dados de três experimentos independentes, que corresponde a 6 animais por tratamento.

3.4.2 Tratamento dos Camundongos com Extrato de *C. ecaliculata* ou *E.grandiflorus*

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos com 6 animais machos cada. O grupo que forma o controle negativo recebeu água destilada (10ml/kg/m.c), o controle positivo recebeu doxorrubicina (5 mg/kg/m.c). Outros três grupos receberam as diferentes concentrações do extrato de *Cordia ecaliculata* e os três grupos restantes receberam as três concentrações do extrato de *Echinodorus grandiflorus*. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 24 horas após a administração via gavagem (exceto o controle positivo: via intraperitoneal) dos tratamentos. Posteriormente quatro novos grupos (6 - 7 animais) foram avaliados, um grupo controle negativo (água destilada 10mL/kg m.c), um controle positivo (doxorrubicina 5 mg/kg/m.c), *Cordia ecaliculata* (2000 mg/kg/mc) e *Echinodorus grandiflorus* (2000 mg/kg/mc). Neste estudo os animais foram sacrificados 48 horas após os tratamentos. As doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg m.c do extrato de *Cordia ecaliculata* e do extrato de *Echinodorus grandiflorus* utilizadas neste estudo foram selecionadas após estudos preliminares. O resultado final das investigações resulta dos dados de três experimentos independentes.

3.5 Teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongos

Imediatamente após a eutanásia, os fêmures são dissecados e a medula óssea é extraída e transferida para um tubo de centrifugação contendo 2 mL de soro fetal bovino (Cultilab) a 37°C. O material foi homogeneizado e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos; ao término da centrifugação descarta-se o sobrenadante tendo o cuidado de deixar um pouco de soro fetal no tubo. As células foram ressuspensas gentilmente e uma gota da suspensão celular foi pingada na extremidade de uma lâmina de microscopia, e com auxílio de outra lâmina é feita a distensão da suspensão celular; o material é seco à temperatura ambiente.

Depois de seco os esfregaços, as lâminas são imersas por 5-10 minutos em metanol 100% para proceder à fixação. Posteriormente as lâminas são coradas com 5% May Grünwald-Giemsa diluído a 5% em tampão fosfato. As lâminas são codificadas e analisadas em microscópio ótico de luz com objetiva de 100x. Foram preparadas duas lâminas por animal e em cada lâmina foram avaliados 1000 eritrócitos policromáticos (PCE) para a quantificação da presença de micronúcleos. A razão PCE/NCE realizada para verificar o índice de citotoxicidade foi estabelecida pela contagem de 200 células por lâmina. O número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) foi determinado pela análise de 2000 PCE por animal. Os dados foram analisados usando o teste t de Student e Anova. Os resultados são considerados positivos quando há aumento estatisticamente significativo ($P < 0.05$) na frequência de MNPCE para as doses avaliadas quando comparadas com o controle negativo (OECD-Guideline 474, 1997; Gewirtz, 1999; Krishna e Hayashi, 2000; Aleisa, *et al* 2007; Guzmán *et al.*, 2007).

O micronúcleo também é conhecido em laboratórios de hematologia pelo nome de corpos de Howell-Jolly. Em roedores adultos a medula óssea e o baço são os órgãos hematopoiéticos responsáveis pela proliferação e maturação das células sanguíneas. Na fase proliferativa as células encontram-se em plena proliferação e se for administrado no animal algum agente teste que interfere neste processo poderá causar danos cromossômicos. Podem provocar quebra cromossômica, trocas e também podem atuar nas macromoléculas relacionadas com a disjunção das cromátides como as tubulinas causando disfunção na formação do fuso. Devido às anomalias, fragmentos ou o cromossomo inteiro pode não ser integrado no núcleo das células-filhas durante a divisão podendo formar o micronúcleo que é visualizado no citoplasma durante a maturação. Quando o eritroblasto desenvolve para eritrócito policromático (PCE) o núcleo é expulso e, se por ventura algum micronúcleo foi formado, ele poderá ser visualizado no citoplasma da célula

anucleada. Portanto, o aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) em animais tratados com uma determinada substância teste é uma indicação que ela induz danos cromossômicos (Krishna e Hayashi, 2000).

A análise de micronúcleo (MN) é bastante usada como um teste genotóxico *in vitro* e biomarcador de exposição humana a agentes com efeitos genotóxicos (Fenech, 2000). O teste do MN permite detectar tanto efeitos clastogênicos quanto aneugênicos (Norppa e Falk, 2003). A avaliação da frequência de micronúcleo *in vivo* é um teste primário na bateria de testes genotóxicos recomendados pelas agências regulatórias em todo o mundo, para assegurar a ausência de risco de produtos e substâncias (Krishna e Hayashi, 2000). Em comparação com a análise de aberrações cromossômicas (AC) o escore de micronúcleo é simples, requer pouco treinamento e pouco tempo. Em princípio pode-se esperar maior sensibilidade do teste de MN em relação ao de aberrações cromossômicas (AC), devido ao aumento do poder estatístico, pois permite análise de um maior número de células.

3.6 Teste do Micronúcleo em Sangue Periférico de Camundongo

Aplicou-se uma gota de sangue periférico sobre uma lâmina de microscopia e com o auxílio de outra realizou-se a distensão do sangue por toda a superfície da lâmina. Os esfregaços sanguíneos devem ser uniformes e para tal a lâmina que se usa para fazer a distensão deve ser posicionada sobre a outra formando um ângulo de 45° e o deslizamento deve ser contínuo. As lâminas são secadas à temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas. Após este período, as lâminas são coradas seguindo o método de Feulgen (Stich *et al.*, 1982) como descrito a seguir. Fixam-se as lâminas por 10 minutos com metanol absoluto, em seguida as distensões são hidrolisadas por 2 minutos à temperatura ambiente, com HCL (1N). Após esta etapa, as lâminas são imersas em HCL (1N) a 60°C por 7 minutos. Em seguida, lavam-se as lâminas com água destilada e colocadas imersa em reagente de Schiff por 90 minutos ao abrigo da luz. Finalizada esta etapa, lavam-se as lâminas por 5 minutos em água corrente. A próxima etapa foi a de coloração do citoplasma com o corante Fast Green. As distensões sanguíneas foram cobertas com um filme de corante Fast Green e deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos; após este período lavam-se as lâminas com três diferentes concentrações de etanol, 85%, 95% e 100% respectivamente. Para finalizar, as lâminas foram secadas à temperatura ambiente (Stich, 1982; Mello, 1997).

3.7 Ensaio Cometa

O “Single-Cell Electrophoresis Assay” ou Ensaio Cometa foi realizado sob condições alcalinas. Inicialmente, 15 µl de cada amostra de sangue ou de células em cultura foram generosamente misturadas com 160 µl de agarose “low-melting-point” (Invitrogen, Carlsbad, CA) na concentração de 0,5% a 37°C, e aplicadas em camada homogênea, com o auxílio de lamínulas (24 x 60mm) sobre uma lâmina de vidro (26 x 76mm), preparada anteriormente com uma fina camada de agarose normal-melting-point (Invitrogen, Carlsbad, CA) na concentração de 1.5 %. Todos estes procedimentos foram feitos ao abrigo da luz e colocados por um intervalo de 4-8 minutos em refrigerador a 4°C; decorrido este período de tempo, as lamínulas são retiradas cuidadosamente e as lâminas são transferidas para cubas de Coplin contendo solução de lise (1% Triton X-100, 2,5 mM NaCl, 0,1 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris with 10% dimetilsulfoxido, pH 10,0) a 4°C recentemente preparada aí permanecendo por no mínimo 12 horas. Após este período, as lâminas são dispostas ordenadamente em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução de eletroforese a 4°C (0,3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH >13) permanecendo imersas por 20 minutos. Usando a mesma solução é feita a “corrida” da eletroforese usando tensão elétrica constante de 1V/cm, corrente de 300mA e tempo de corrida de 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas por 15 minutos em solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7.5). Após este período, as lâminas foram fixadas por 5 minutos em etanol 100% , e deixadas para secar na temperatura ambiente. Depois de secas, as lâminas são apropriadamente estocadas em caixas e deixadas na temperatura ambiente até o momento da coloração. Posteriormente, as lâminas são coradas com prata seguindo a seguintes etapas: primeiros as lâminas são imersas por 10 minutos em solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5%, glicerol 15%), após são lavadas com água destilada e deixadas secar a temperatura ambiente. Depois de secas, são imersas em água destilada por 5 minutos; em seguida, foram colocadas na solução de coloração preparada minutos antes que resulta da mistura da solução A (carbonato de sódio 5%) com a solução B (nitrato de amônia 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido tungstosilicico 0,25% e formaldeído 0,15%). As lâminas foram colocadas em “shaker” por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz; decorrido este período, as lâminas foram lavadas com água destilada e imersas em solução “stop” (ácido acético 1%) por 5 minutos para paralisar a coloração; dando seqüência, as lâminas foram lavadas novamente com água destilada e deixadas secar a temperatura ambiente. A partir deste momento, elas estão prontas para análise microscópica. As lâminas foram examinadas com objetiva 40X em microscópio óptico de luz. As lâminas

codificadas foram avaliadas em “teste cego” e 100 nucleóides foram analisados por tratamento (50 nucleóides por lâmina e duas lâminas por tratamento). Os nucleóides são classificados de acordo com o tamanho da cauda visualizada em 5 classes, sendo os não danificados pertencentes a classe zero (0) e os nucleóides totalmente danificados a classe quatro (4). O valor (índice de dano) é atribuído para cada nucleóide analisado de acordo com sua classe. O índice de dano varia de zero (0) quando todos os nucleóides não apresentam danos (100 nucleóides x 0) a quatrocentos quando todos os nucleóides apresentam nível máximo de danos (100 nucleóides x 4). Nucleóides com alterações atípicas foram desconsiderados na contagem, pois os mesmos podem ser oriundos de células mortas (Hartmann e Speit, 1997; Tice *et al.*, 2000).

O Ensaio Cometa é amplamente aceito na atualidade como um método padrão para avaliar danos no DNA de células individuais. Ele tem sido utilizado para uma ampla variedade de aplicação, incluindo biomonitoramento humano, genotoxicologia, monitoramento ecológico e como ferramenta para investigar danos no DNA e reparo, em diferentes tipos celulares, em resposta a uma ampla quantidade de agentes genotóxicos. Além disso, muitos estudos têm demonstrado com sucesso que o Ensaio Cometa pode ser aplicado para análise de células derivadas de vários tecidos diferentes indicando que este ensaio poderá ser importante em muitas áreas de investigações clínicas, por permitir obter informações importantes sobre as características intrínsecas do DNA de células individuais, e sua resposta a vários fatores externos como radiação, substâncias químicas e drogas. Estas informações poderão ser relevantes no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer. Do ponto de vista prático, o Ensaio Cometa poderá ser satisfatoriamente utilizado na rotina clínica por ser uma técnica relativamente simples, barata, que requer poucas células para análise, e o resultado pode ser obtido dentro de algumas horas (McKenna *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2008).

Este ensaio tem a vantagem de poder ser feito com células que não estão em proliferação, e células de um determinado tecido podem ser avaliadas em grande número. Diretriz elaborada pela “Organisation for Economic Cooperation and Development” (OECD) estabelecem as normas para a realização do Ensaio Cometa na versão alcalina (pH 13) para determinar genotoxicidade *in vivo*. A validação do Ensaio Cometa *in vivo* é planejada pelo “Mammalian Mutagenesis Study Group (MMS)/Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JCVAM)”. Os métodos *in vitro* também estão sendo desenvolvidos visando futura validação. De forma que o Ensaio Cometa pode ser aplicado em testes genotóxicos tradicionais *in vivo* e *in vitro*, em

ecotoxicologia, toxicologia aquática, investigação em indústria química, farmacêutica, de biocidas, agroquímicas, química de alimentos bem como seus aditivos. Ele também é usado como biomarcador em câncer e estudos nutricionais (Lovell e Omori, 2008)

O Ensaio Cometa (SCGE) é um método muito promissor, pois permite a detecção de danos no DNA em uma população de células eucarióticas obtidas de uma simples suspensão celular. Este ensaio é usado para diferentes tipos de estudo incluindo: reparos de danos no DNA, biomonitoramento humano e toxicologia genética (Fracasso *et al.*, 2004; Hoffmann e Speit, 2005). Esse ensaio é também considerado um método versátil e sensível para avaliar quebras na fita simples e dupla do DNA. O “cometa” é formado quando os nucleóides são expostos em condições alcalinas ou neutras a um campo eletroforético. Caso haja quebra na fita de DNA a estrutura compacta relaxará e alças da fita de DNA rompida se estenderá formando halos semelhante a cauda de um cometa. As alças rompidas migram em direção ao ânodo (pólo positivo) e a extensão e densidade da cauda estão diretamente relacionadas com o nível de danos.

Os resultados do Ensaio Cometa variam consideravelmente nas publicações científicas. Uma das causas desta variação é a falta de protocolo padrão para a realização de eletroforese. Os protocolos que são descritos freqüentemente são insuficientes. Normalmente afirmam que a eletroforese é realizada em uma voltagem fixa de 25 V e uma corrente de 300mA que é alcançada ajustando o volume da solução de eletroforese. Na maioria das cubas de eletroforese fica apenas uma camada de poucos mm de solução sobre a plataforma onde as lâminas são posicionadas para a eletroforese. A maioria da voltagem aplicada pode atravessar esta área devido a sua alta resistência ôhmica. Uma pequena variação no volume de solução ao longo da superfície pode ter significativo efeito na voltagem juntamente com a temperatura e pH. Deve ser enfatizado que o total de voltagem e corrente aplicados em teoria são irrelevantes, desde que esta voltagem atravesse o gel (V/cm na plataforma) que é a força motriz para eletroforese de moléculas de DNA carregadas. Adicionando mais solução de eletroforese levará a diminuição da V/cm na plataforma, a menos que o total de voltagem aplicada seja similarmente aumentada. Deve ser notado que no protocolo original de Singh *et al.*, (1988), uma camada de solução fina sobre o gel é especificada junto com a voltagem total de 25V. Não há menção de uma corrente particular; o hábito de trabalhar com 300mA deve-se possivelmente ao fato de que fontes com potencial maior são mais caras. Na descrição de eletroforese para publicação o único parâmetro relevante que deve ser especificado é a V/cm através da plataforma (Collins *et al.*, 2008).

3.8 Verificação da Eficácia dos Extratos Etanólicos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* no Tratamento da Obesidade

Os comundongos Swiss machos recém desmamados (12 ± 2 g) foram escolhidos aleatoriamente e distribuídos em 3 grupos com 5 animais cada. Em um grupo os animais foram tratados diariamente com água estéril 10 ml/kg m.c (massa corporal), em outro com extrato de *C. ecalyculata* (porangaba) 2000 mg/kg m.c e o outro com extrato de *E. grandiflorus* (chapéu-de-couro) 2000 mg/kg m.c; ambos os extratos foram dissolvidos em água estéril e ministrados por meio de gavagem, no volume de 10 ml/kg m.c, uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos. Diariamente a massa dos animais, a massa de ração e o volume de água consumido foram registrados. Ao fim do período foi calculada a média do ganho de massa, a média da massa de ração consumida e a média do volume de água ingerido. Os animais foram sacrificados e o sangue e a medula óssea foi coletada para realização do Teste do Micronúcleo e teste citotóxico.

3.9 Cultura de Células CHO

Células do ovário de hamster Chinês (CHO-K1), originária da Faculdade de Medicina de Universidade de Leiden (Netherlands), foram obtidas no laboratório de Citogenética e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sobre a custódia da Prof^a. Dra. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo.

As células CHO-K1 foram cultivadas em frasco de cultura 25 cm² (Corning Glass, Corning, NY) e deixadas em crescimento até atingir a confluência usando 10 mL de meio de cultura Ham's-F10 + D-MEM (1:1) (Invitrogen, Grand Island, NY and Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1,2 g/L de bicarbonato de sódio (Reagen) e antibióticos (0,06 g/L penicilina, 0,10 g/L estreptomicina- Sigma, 0,05 g/mL kanamicina- Gibco) and ciprofloxacina 0,2% (Ciprofloxan® - Hipolabor) e HEPES (2,38 g/L - Serva), incubado a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂. As células ao atingir a confluência são transferidas para um tubo de centrifugação e centrifugadas a 1000 rpm (180 g) por 5 minutos. Após a centrifugação despreza-se o sobrenadante, ressuspende as células e procede a contagem em câmara de Neubauer. Usando uma placa com 6 poços (Corning Glass) foi dispensado em cada poço 5×10^5 células.

3.10 Tratamentos com Dietilpropiona

As doses de dietilpropiona utilizadas para a realização deste experimento foram determinadas através de teste piloto. Para aferir a citotoxicidade utilizamos a metodologia do azul de tripam. O esquema de tratamento segue a seguinte orientação temporal:

- Tempo zero: foram semeadas 5×10^5 células por poço;
- Após 20 horas foi feito o tratamento com dietilpropiona;
- Após 40 horas retiram-se as alíquotas para realização do ensaio cometa e viabilidade celular; aplicou-se citocalasina B nos tratamentos para realizar o teste do micronúcleo;
- Após 54 horas retiram-se as alíquotas para realização do teste do micronúcleo.

Utilizou-se os seguintes tratamentos:

- Controle negativo (meio de cultura);
- Controle positivo (doxorrubicina 0,15 $\mu\text{g/mL}$);
- Dietilpropiona 10 $\mu\text{g/mL}$;
- Dietilpropiona 20 $\mu\text{g/mL}$;
- Dietilpropiona 40 $\mu\text{g/mL}$.

Foram feitos três experimentos diferentes e tanto o fármaco quanto o controle positivo são dissolvidos no próprio meio de cultura.

3.11 Determinação do Índice Apoptótico

Prepara-se 100 μL de uma solução corante constituída por 25 μL de iodeto de propídio (PI) dissolvido na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ em água destilada; 50 μL de diacetato de fluoresceína (DAF) na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ em DMSO; 10 μL de Hoechst 33342 (HO) na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ em água e 15 $\mu\text{g/mL}$ de PBS (pH= 8).

Pegar o frasco com as células em cultura, transferir o meio para um tubo de centrifugação em seguida lavar o frasco de cultura com 5 mL de Hanks e misturar este Hanks com o meio adicionado no tubo de centrifugação. Usar 2 mL de tripsina mais 2 mL de Hanks para soltar as células do frasco de cultura. Após verificar que as células estão soltas adicionar o meio que está no tubo de centrifugação no frasco de cultura para inativar a tripsina. Retornar este o conteúdo do frasco de cultura para o tubo de centrifugação e centrifugar por 5 minutos a 1000 rpm. Descartar o sobrenadante deixando uma pequena quantidade para ressuspender as células.

Colocar um tubo para microcentrifugação, 100 μL da suspensão celular e 2 μL da solução de corantes. Homogeneizar e levar ao banho-maria a 37°C por 5 minutos. Pingar 15 μL desta mistura em uma lâmina cobrir com lamínula. Contar imediatamente as células usando

microscópio de fluorescência com filtro triplo (DAP, propídio e FITC). Nas células normais o citoplasma fica verde com o núcleo íntegro; células apoptóticas citoplasma verde com núcleo fragmentado (corpos apoptóticos corados em azul) e células necróticas com núcleo e citoplasma corados homogeneamente em vermelho. Foram feitos três experimentos independentes e, em cada experimento avaliou-se 500 células por tratamento.

3.12 Teste do Micronúcleo em Cultura de Células CHO

A técnica utilizada neste estudo para examinar micronúcleos em células binucleadas é a descrita por Fenech e Morley (1985). Após completar os tratamentos, as células são lavadas com 6 mL de Hanks, Tripsinizadas (0,24% trypsin-0,02% Versene; Instituto Adolfo Lutz, Brasil) e centrifugada por 5 minutos a 900 rpm. As células são ressuspensas em 5 mL de solução hipotônica (Citrato de sódio 1%) a 4°C. Adiciona-se 3 gotas de formaldeído e homogeneizar cuidadosamente com pipeta Pasteur. Esta suspensão celular é centrifugada novamente por 5 minutos a 900 rpm e ressuspensa em 5 mL de fixador (metanol/ácido acético 3:1 v/v). Esta operação é repetida por mais duas vezes e, o sobrenadante descartado. A suspensão celular é aplicada em uma lâmina com um filme de água destilada a 4°C.

As lâminas são coradas com uma solução de Giemsa a 3% diluída em solução de tampão fosfato (0,06 M Na₂HPO₄ e 0,06 M KH₂PO₄, pH 6,8) por 5-10 minutos, lavadas com água destilada, e deixadas secar a temperatura ambiente e após estão prontas para a análise microscópica. A quantificação de micronúcleos foi determinada em 1000 células binucleadas com o citoplasma bem preservado. Os critérios para identificação do micronúcleo são os recomendados por Fenech (2000).

3.13 Índice de Divisão Nuclear (IDN)

O índice de divisão nuclear (IDN) foi determinado pela análise de 1000 células por lâmina. Somente as células com o citoplasma bem preservado, contendo de 1 a 4 núcleos foram computadas com auxílio de contador de células digital e microscópio óptico de luz. O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (1989), usando a seguinte fórmula:

$$\text{IDN} = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$$

Onde M1 - M4 são os números de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente; N é o número total de células analisadas.

3.14 Linfócitos de Indivíduos Obesos

Os indivíduos obesos que foram convidados para participar do estudo são pacientes atendidos no Ambulatório de Nutrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Chefiado pelo Prof. Dr. José Ernesto dos Santos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, do Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HCRP Nº 4684/2006, anexo D).

Em média 20 mL de sangue venoso foram colhidos de cada voluntário após a apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (em anexo), e esclarecimento de todas as dúvidas e concordância em participar. Participaram do estudo 3 homens e 5 mulheres obesas (IMC: 40 - 62 kg/m²) com idade entre 30 - 45 anos, que não apresentam problemas genéticos diagnosticados. O cultivo de linfócitos humanos seguiu a metodologia de Moorhead *et al* (1960), com algumas modificações como descritas a seguir: Após a punção venosa o sangue é de imediato transferido para tubos contendo heparina e deixado em repouso, a temperatura ambiente, para a decantação das células e separação do plasma. Feito isto é colhido com auxílio de pipeta Pasteur o “anel leucocitário” juntamente com uma pequena quantidade de plasma; após homogeneização do material, aproximadamente 12-15 gotas são pingadas com o auxílio da pipeta Pasteur em frasco de cultura contendo 5 mL de meio de cultura completo, composto por 78% de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma), suplementado com estreptomicina (0,01mg/mL), penicilina (0,005 mg/mL), 20% de soro fetal bovino(Cultilab) e 2% de fitohemaglutinina (Gibco). Esses frascos são mantidos em estufa a 37°C até que complete o tempo de cultivo.

3.15 Tratamentos dos Linfócitos

Para definir as concentrações usadas neste estudo foram feitos ensaios pilotos. A partir dos dados preliminares estabeleceu-se as seguintes concentrações testes: controle negativo (meio de cultura), controle positivo (doxorubicina 0,02 µg/mL de meio de cultura), femproporex (5, 10 e 20 µg/mL de meio de cultura), sibutramina (5, 10 e 20 µg/mL de meio de cultura), *C. ecalyculata* (25, 50,80 µg/mL de meio de cultura) e *E. grandiflorus* (25, 50, 80 µg/mL de meio de cultura). Para cada amostra de sangue coletada (indivíduo) foram feitos 14 frascos de meio de cultura e distribuídos os tratamentos.

Após 24 horas de cultura, colheu-se uma alíquota para realização do Ensaio Cometa (T0), e adicionou-se os tratamentos, retornando os frascos para a câmara de cultura por mais 24 horas.

Decorrido este período foram retiradas alíquotas (500 μ L) para realização do Ensaio Cometa (semelhante ao descrito no item 2.7) e a suspensão celular restante foi concentrado por centrifugação (1000 rpm/5 minutos), desprezado o sobrenadante e adicionado 5 mL de meio de cultura completo (como descrito no item 2.14) juntamente com 5,0 μ g/mL de meio de cultura de citocalasina B. Após generosa homogeneização os frascos de cultura retornam para a câmara de cultura por mais 28 horas. Decorrido este período as células são colhidas para a realização do Teste, cuja técnica foi semelhante à usada nos itens 2.12 e 2.13 com a exceção que aqui as células não estão aderidas.

3.16 Teste de Viabilidade Celular com Azul de Tripán

- retirar 10 μ L de suspensão celular do meio de cultura;
- misturar à 10 μ L de solução de azul de Tripán (0,04 mg/mL);
- após 3 minutos esse material é depositado em câmara de Neubauer e coberto com lamínula;
- contam-se 200 células em dois campos de observação;
- as células viáveis não coram. As células inviáveis coram em azul;
- o resultado é dado em porcentagem de células vivas (viáveis).

Consideram-se viáveis para a realização do teste do cometa as culturas que apresentam uma viabilidade celular acima de 70%.

3.17 Análise Estatística

Os dados em todo o estudo foram analisados usando os testes “One-Way ANOVA” e teste t Student. Em todas as avaliações consideramos um nível de significância de 5%. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Para realização dos testes usou-se o programa estatístico SigmaStat para Windows Versão 1.0. Copyright© 1992 – 1994, Jandel Corporation.

William Sealy Gosset (1876 – 1937), cujos trabalhos científicos assinava com o pseudônimo “Student”, em 1908 descobriu a distribuição de uma quantidade denominada t, que revolucionou os métodos estatísticos de estudo de pequenas amostras. O valor t é a medida do desvio entre a média (\bar{x}), estimada a partir de uma amostra aleatória de tamanho n , e a média (μ) da população, usando o erro da média (s_x) como unidade de medida (Beiguelman, 1994).

4. RESULTADOS

4.1 Teste do Micronúcleo em Células de Medula Óssea de Camundongo

4.1.1 Avaliação de sibutramina e femproporex

Verifica-se aumento significativo ($P < 0.05$) na média de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) nos grupos que receberam tratamentos com os fármacos sibutramina ou femproporex nas concentrações de 10 mg/kg m.c, 20 mg/kg m.c e 40 mg/kg m.c, quando comparados com o grupo controle negativo (tratamento com água destilada). Quanto às diferentes concentrações de sibutramina ou femproporex utilizadas neste estudo, observa-se relação dose-resposta, ou seja, o aumento da dose acarreta no aumento do número de MNPCE (**Figura 6**).

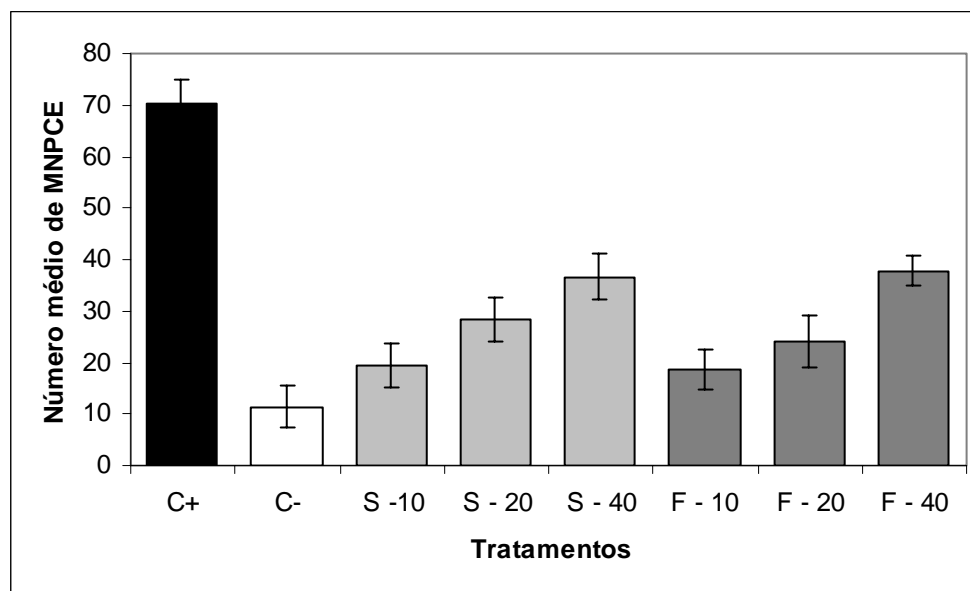


Figura 6: Frequências médias de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE/ 1000 PCE), observados em medula óssea de camundongos machos da linhagem Swiss, 24 horas após os tratamentos. C+ (doxorubicina 5,0 mg/kg m.c), C- (água destilada), S-10 (sibutramina a 10 mg/kg m.c), S-20 (sibutramina a 20 mg/kg m.c), S-40 (sibutramina a 40mg/kg m.c), F-10 (femproporex 10 mg/kg m.c), F-20 (femproporex a 20 mg/kg m.c) e F-40 (femproporex a 40 mg/kg m.c).

Examinando-se o tecido medular dos animais 24 horas após o tratamento com as três diferentes concentrações de sibutramina, não foram verificadas diferenças significativas nas razões PCE/NCE em comparação com o controle negativo ($P > 0.05$). Nos grupos tratados com o femproporex, foi observada diferença significativa somente entre o controle negativo e os grupos

tratados com as concentrações de 20 e 40 mg/kg m.c, que apresentaram valores discretamente superiores ($P<0.05$) (**Figura 7**).

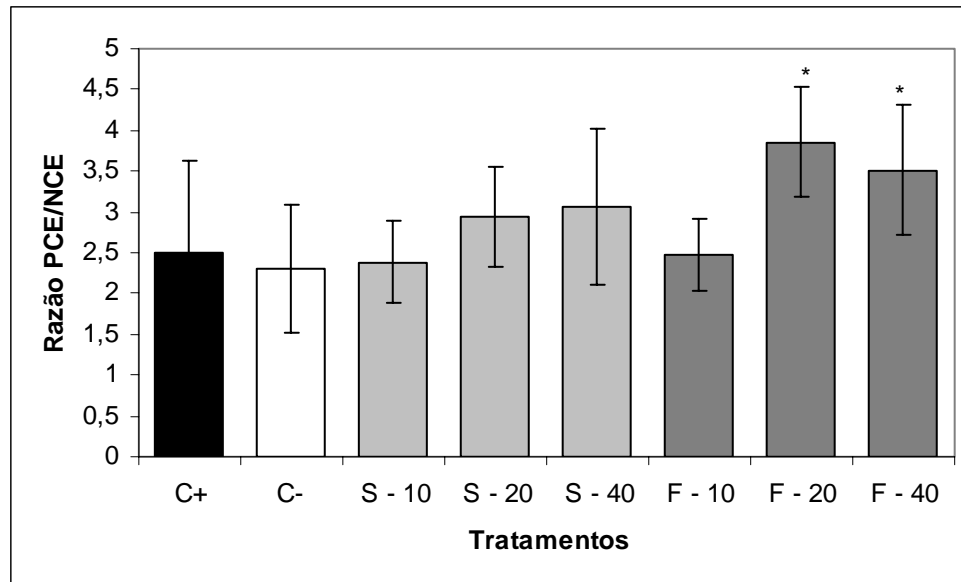


Figura 7: Razão PCE/NCE em medula óssea de camundongos Swiss examinada 24 horas após os tratamentos. C+ (doxorrubicina 5,0 mg/kg m.c), C- (água destilada), S – 10 (sibutramina a 10 mg/kg m.c), S – 20 (sibutramina a 20 mg/kg m.c), S – 40 (sibutramina a 40 mg/kg m.c), F – 10 (femproporex 10 mg/kg m.c), F – 20 (femproporex a 20 mg/kg m.c) e F – 40 (femproporex a 40 mg/kg m.c).

* valores significativamente diferentes do controle negativo ($P<0.05$) aprofundado pelo teste t de Student.

Foi observada redução significativa nas médias de MNPCE nos tratamentos controle negativo; sibutramina e femproporex, na concentração de 40 mg/kg m.c, em análises realizadas 48 horas após os tratamentos ($P<0.05$) (**Figura 8**).

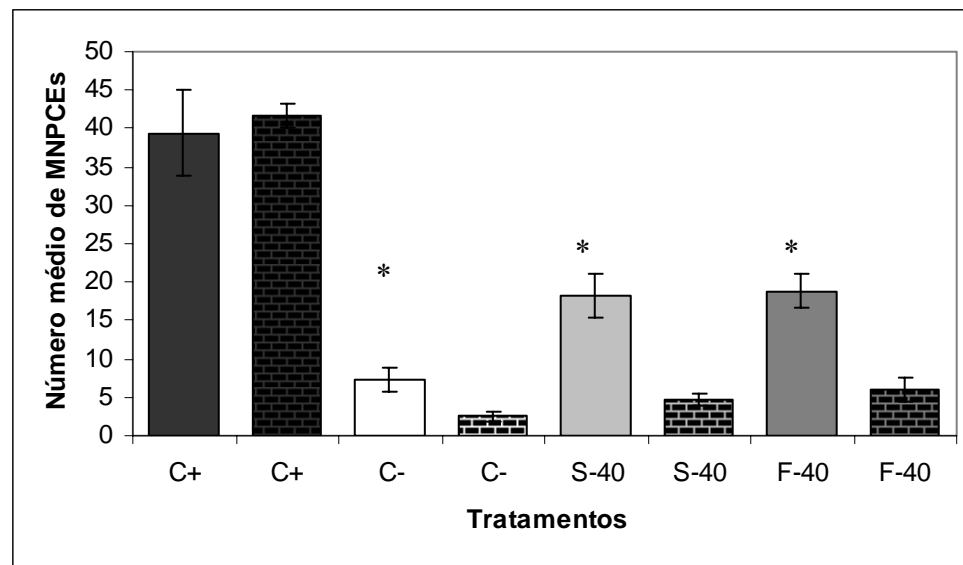


Figura 8: Frequência média de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE/ 1000 PCE), analisados em medula óssea de camundongos machos da linhagem Swiss 24 horas (barras lisas) e 48 horas (barras texturizadas) após os tratamentos. C+ (doxorubicina 5,0 mg/kg m.c), C- (água destilada), S – 40 (sibutramina a 40 mg/kg m.c), F – 40 (femproporex a 40 mg/kg m.c). * valores significativamente diferentes ($P < 0.05$) na comparação entre 24 horas e 48 horas de exposição para o mesmo tipo de tratamento afixado pelo teste t de Student.

Analisando-se a razão PCE/NCE, após 48 horas de tratamento, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos tratados com sibutramina e femproporex em comparação com o controle negativo ($P > 0.05$) (**Figura 9**).

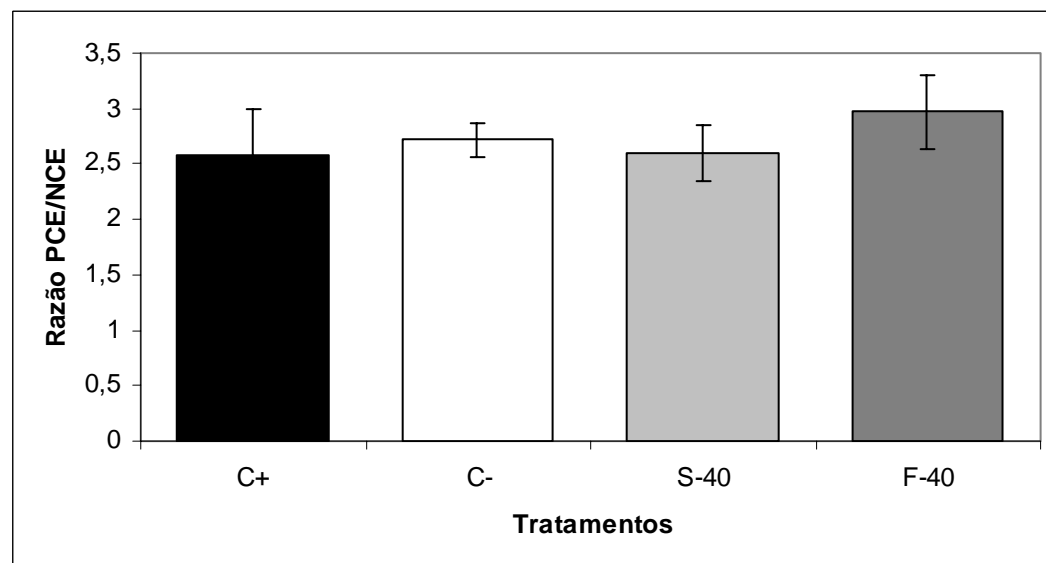


Figura 9: Razão PCE/NCE em medula óssea de camundongos Swiss examinada 48 horas após os tratamentos. C+ (doxorubicina 5,0 mg/kg m.c), C- (água destilada), S – 40 (sibutramina a 40 mg/kg m.c) e F – 40 (femproporex a 40 mg/kg m.c).

4.1.2 Avaliação dos extratos de *E. grandiflorus* e *C. ecalyculata*

Tanto o extrato de *C. ecalyculata* quanto o de *E. grandiflorus*, nas concentrações avaliadas, não apresentaram diferenças significativas ($P > 0.05$) na média das frequências de eritrócitos policromáticos, quando comparados com o tratamento controle negativo. Também não foram observadas variações significativas nas frequências médias de MNsPCE ($P > 0.05$) entre as diferentes concentrações para os dois fitoterápicos (**Tabela 1**).

Quanto a razão entre PCE/NCE, não há diferenças ($P > 0.05$) para os tratamentos com as diferentes concentrações do fitoterápico *E. grandiflorus* em comparação ao tratamento controle negativo. O fitoterápico *C. ecalyculata* nas concentrações de 1000 e 2000 mg/kg m.c possui valor da razão PCE/NCE significativamente superior ($P < 0.05$) quando comparado ao tratamento controle negativo (**Tabela 1**).

Tabela 1: Frequência média de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNsPCE) e relação PCE/NCE, analisadas em medula óssea (fêmur) de camundongos machos da linhagem Swiss 24 horas após os tratamentos.

Tratamentos	Doses	Número de PCE Analisados (n° de animais)	Média de MNPCE/2000PCE	Média da Razão PCE/NCE ^a
Controle negativo (H ₂ O)	10 mL/kg m.c	12000 6	7,667 ± 2,066	2,577 ± 0,218
Doxorrubicina	5.0 mg/Kg m.c	12000 6	35,000 ± 6,066*	2,287 ± 0,180
<i>C. ecalyculata</i>	500 mg/Kg m.c	12000 6	8,167 ± 1,329	2,648 ± 0,145
<i>C. ecalyculata</i>	1000 mg/Kg m.c	12000 6	10,500 ± 2,345	2,849 ± 0,196*
<i>C. ecalyculata</i>	2000 mg/Kg m.c	12000 6	8,667 ± 2,422	3,157 ± 0,370*
<i>E. grandiflorus</i>	500 mg/Kg m.c	12000 6	8,833 ± 1,722	2,618 ± 0,199
<i>E. grandiflorus</i>	1000 mg/Kg m.c	12000 6	10,500 ± 2,429	2,663 ± 0,213
<i>E. grandiflorus</i>	2000 mg/Kg m.c	12000 6	9,500 ± 2,811	2,631 ± 0,146

* valores diferentes do controle negativo ($P < 0.05$) afixado pelo teste t de Student.

^a foram avaliadas 400 células por animal.

Nos tratamentos crônicos por 15 dias consecutivos com uma dose diária de 2000 mg/kg m.c dos extratos hidretanólicos dos fitoterápicos, não houve elevações nas médias ($P>0.05$) de MNPCes quando comparado com o controle negativo (**Figura 10**).

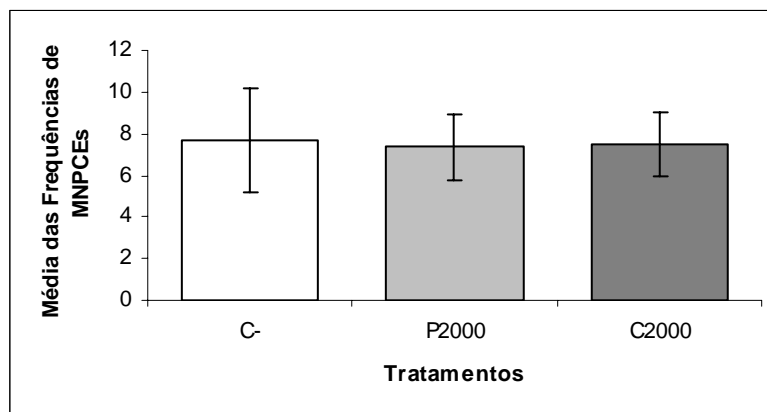


Figura 10: Médias das frequências de MNPCes na medula óssea de camundongos Swiss examinada 15 dias após tratamento diário com C- (água destilada 10 mL/kg m.c), P2000 (*C. ecalyculata* a 2000 mg/kg m.c) e C2000 (*E. grandiflorus* a 2000 mg/kg m.c).

Quanto à razão PCE/NCE não há diminuição dos valores em comparação com o controle negativo, após 15 dias consecutivos de tratamento, e sim, uma discreta elevação do valor do tratamento com porangaba ($P<0.05$) (**Figura 11**).

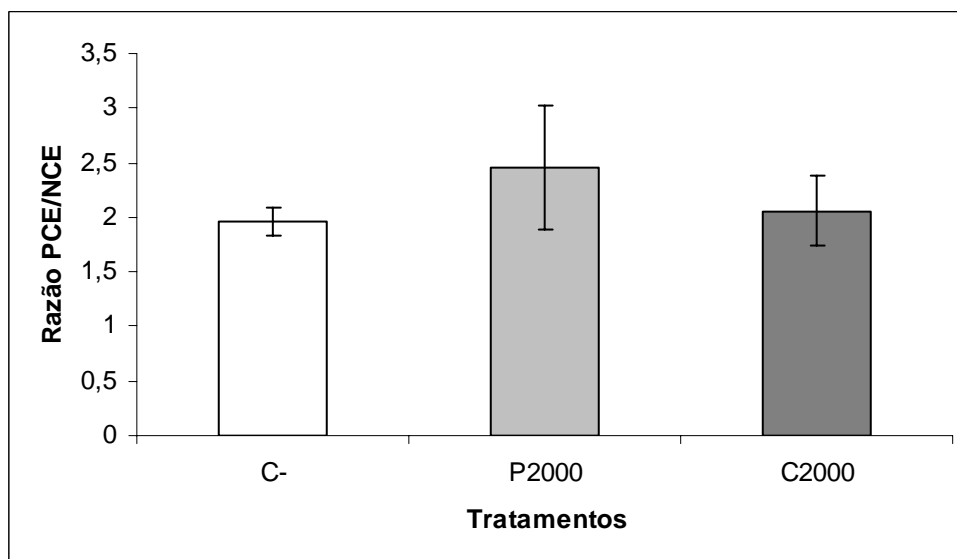


Figura 11: Razão PCE/NCE em medula óssea de camundongos Swiss examinada 15 dias após tratamento diário com C- (água destilada 10mL/kg m.c), P2000 (*C. ecalyculata* a 2000 mg/kg m.c) e C2000 (*E. grandiflorus* a 2000 mg/kg m.c).

4.2 Teste do Micronúcleo em Sangue Periférico de Camundongo

4.2.1 Avaliação de sibutramina e femproporex

Os tratamentos com o fármaco sibutramina, nas concentrações de 10 mg/kg m.c, 20 mg/kg m.c e 40 mg/kg m.c, elevaram significativamente a frequência de hemácias micronucleadas ($P < 0.05$), no sangue periférico de camundongos Swiss, após 24 horas de tratamento, em comparação com o tratamento controle negativo. Não foi verificada diferença significativa ($P > 0.05$) quando se comparou o valor médio de hemácias micronucleadas, do grupo tratado com sibutramina a 10 mg/kg m.c com o grupo tratado com 20 mg/kg m.c. No entanto, o grupo de animais tratados com sibutramina a 40 mg/kg possui valor médio de hemácias micronucleadas superior ($P < 0.05$) aos dois grupos tratados com as outras concentrações.

Os tratamentos com o fármaco femproporex, nas concentrações de 10 mg/kg m.c, 20 mg/kg m.c e 40 mg/kg m.c, também elevam a frequência média de hemácias micronucleadas ($P < 0.05$) em comparação com o tratamento controle negativo. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0.05$) na frequência média de hemácias micronucleadas, quando comparadas as diferentes concentrações de femproporex entre si (**Figura 12**).

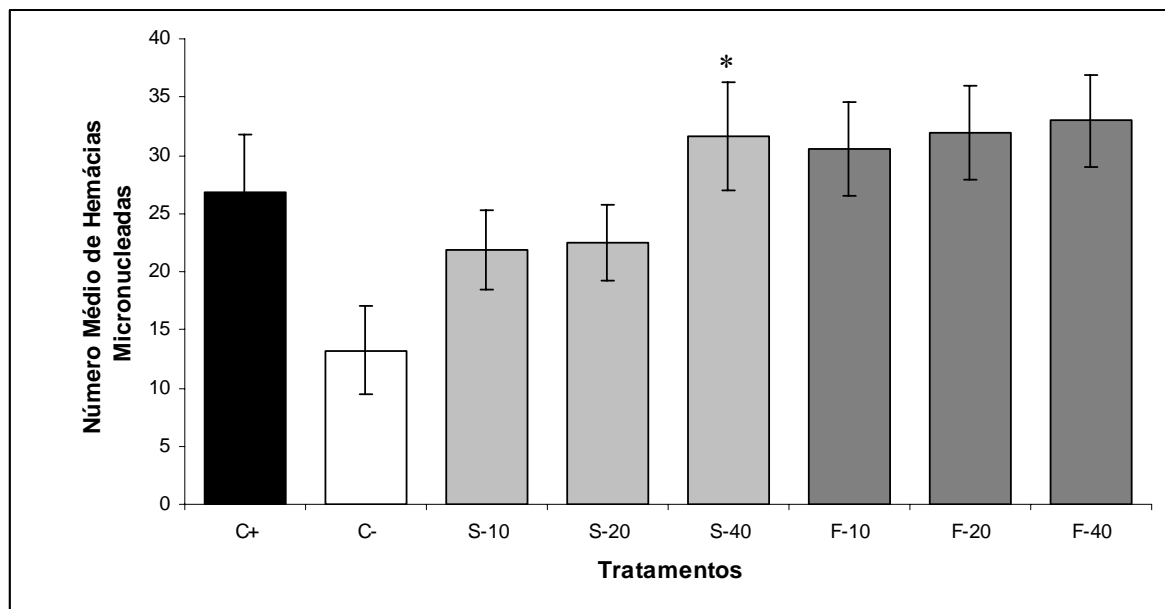


Figura 12: Frequência média de hemácias micronucleadas em 1000 hemácias de sangue periférico de camundongo Swiss verificada 24 horas após os tratamentos. C+ (Doxorrubicina 5,0 mg/kg m.c), C- (água destilada), S- 10 (sibutramina a 10 mg/kg m.c), S – 20 (sibutramina a 20 mg/kg m.c), S – 40 (sibutramina a 40 mg/kg m.c), F – 10 (femproporex 10 mg/kg m.c), F -20 (femproporex a 20 mg/kg m.c) e F – 40 (femproporex a 40 mg/kg m.c). Foram analisadas 2000 hemácias por animal e 6-8 animais por tratamento.

*Valor diferente ($P < 0.05$) dentro do mesmo tratamento afixado pelo teste t de Student.

Os fármacos sibutramina e femproporex, na concentração de 40 mg/kg m.c, elevam significativamente o número médio de hemácias micronucleadas ($P<0.05$), no sangue periférico de camundongo Swiss, após 48 h de tratamento, em relação ao controle negativo. Quando comparados os grupos de 48 horas com os grupos de 24 horas após o tratamento, verificou-se que ocorre um decréscimo significativo ($P<0.05$) no número médio de hemácias micronucleadas nos animais tratados com sibutramina ou femproporex, na concentração de 40 mg/kg m.c. Não foi observada diferença significativa ($P>0.05$) para o tratamento controle negativo quando se compara estes dois períodos. Para o tratamento controle positivo, também foi observado um decréscimo significativo ($P<0.05$) no número médio de eritrócitos micronucleados após 48 horas de tratamento (**Figura 13**).

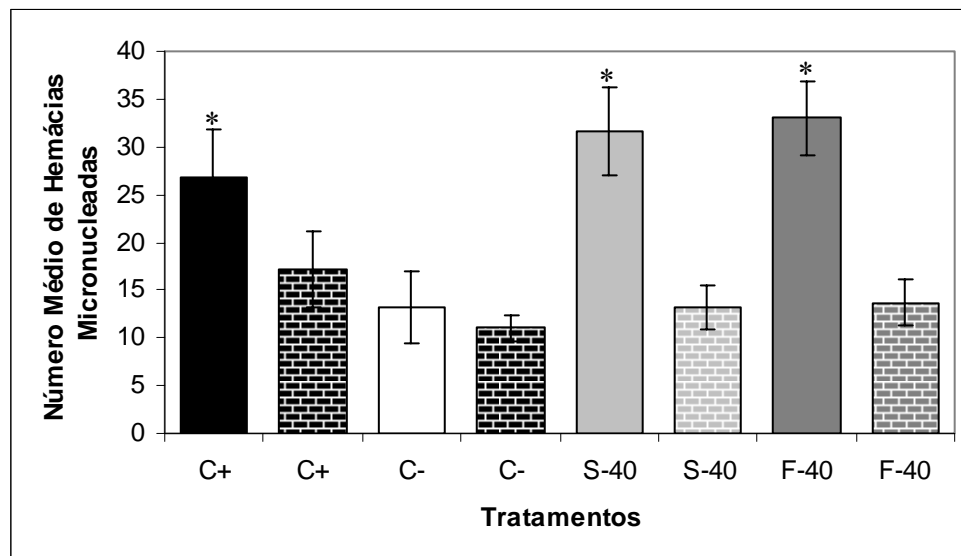


Figura 13: Frequência média de hemácias micronucleadas em 1000 hemácias de sangue periférico de camundongo Swiss verificada 24 horas (barras lisas) e 48 horas (barras texturizadas) após os tratamentos. C+ (doxorrubicina 5,0 mg/kg m.c), C- (água destilada), S – 40 (sibutramina a 40 mg/kg m.c), F – 40 (femproporex a 40 mg/kg m.c). Foram analisadas 2000 hemácias por animal e 6-7 animais por tratamento.

* valores diferentes ($P<0.05$) comparando dois períodos de exposição do mesmo tratamento aprofundado pelo teste t de Student.

4.2.2 Avaliação dos extratos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus*

As frequências de hemácias micronucleadas, tanto para tratamentos com *C. ecalyculata*, quanto para tratamentos com *E. grandiflorus*, são significativamente maiores ($P<0.05$), quando comparadas com a frequência do tratamento controle negativo. Não há variações nas frequências de hemácias ($P>0.05$) entre as diferentes concentrações dos fitoterápicos dentro dos tratamentos (**Tabela 2**).

Tabela 2: Frequência média de hemácias micronucleadas em sangue periférico de camundongos Swiss verificada 24 horas após os tratamentos.

Tratamentos	Dose	Número de hemácias analisadas ^a	Número de hemácias com micronúcleos	Frequência de hemácias micronucleadas/2000
Controle negativo (H ₂ O)	10 mL/kg m.c	12000	108	18,000 ± 2 ,683
Doxorrubicina	5.0 mg/Kg m.c	12000	226	37,667 ± 3,830
<i>C. ecalyculata</i>	500 mg/Kg m.c	12000	133	22,167 ± 3,545
<i>C. ecalyculata</i>	1000 mg/Kg m.c	12000	129	21,500 ± 2,429
<i>C. ecalyculata</i>	2000 mg/Kg m.c	12000	127	21,167 ± 2,401
<i>E. grandiflorus</i>	500 mg/Kg m.c	12000	165	27,500 ± 5,753
<i>E. grandiflorus</i>	1000 mg/Kg m.c	12000	158	26,333 ± 4,676
<i>E. grandiflorus</i>	2000 mg/Kg m.c	12000	158	26,333 ± 5,922

^a foram utilizados seis animais por tratamento.

No sangue periférico, as médias das hemácias micronucleadas nos animais tratados com os extratos dos fitoterápicos por 15 dias consecutivos são superiores ($P < 0.05$) à do tratamento controle negativo (**Figura 14**).

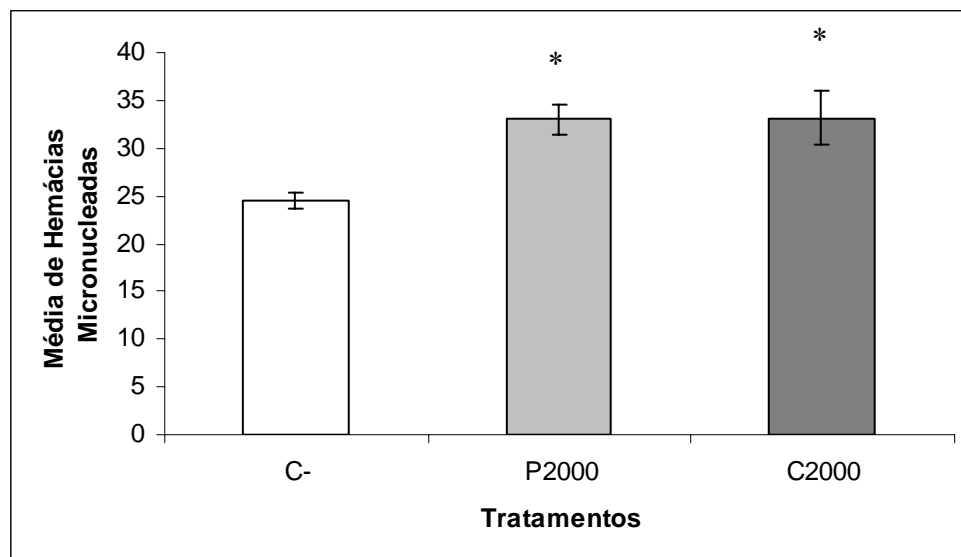


Figura 14: Frequência média de hemácias micronucleadas em 1000 hemácias de sangue periférico de camundongos Swiss verificada 15 dias após o tratamento diário com C- (água destilada 10 mL/kg m.c), P2000 (*C. ecalyculata* a 2000 mg/kg m.c) e C2000 (*E. grandiflorus* a 2000 mg/kg m.c). Foram analisadas 2000 hemácias por animal e 5 animais por tratamento.

* valores diferentes ($P < 0.05$) comparado com o controle negativo afixado pelo teste t de Student.

4.3 Teste do Micronúcleo em Cultura de CHO Tratadas com Dietilpropiona

Ao avaliar os possíveis danos aneugênicos e/ou clastogênicos, verificou-se que não existem diferenças significativas nas frequências médias de células micronucleadas quando comparados os diferentes tratamentos com dietilpropiona com o controle negativo. Ainda que, no tratamento com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seja possível perceber discreto aumento no valor numérico, o mesmo não é significativo ($P > 0.05$) para atribuir esta diferença à interferência do fármaco (**Figura 15**)

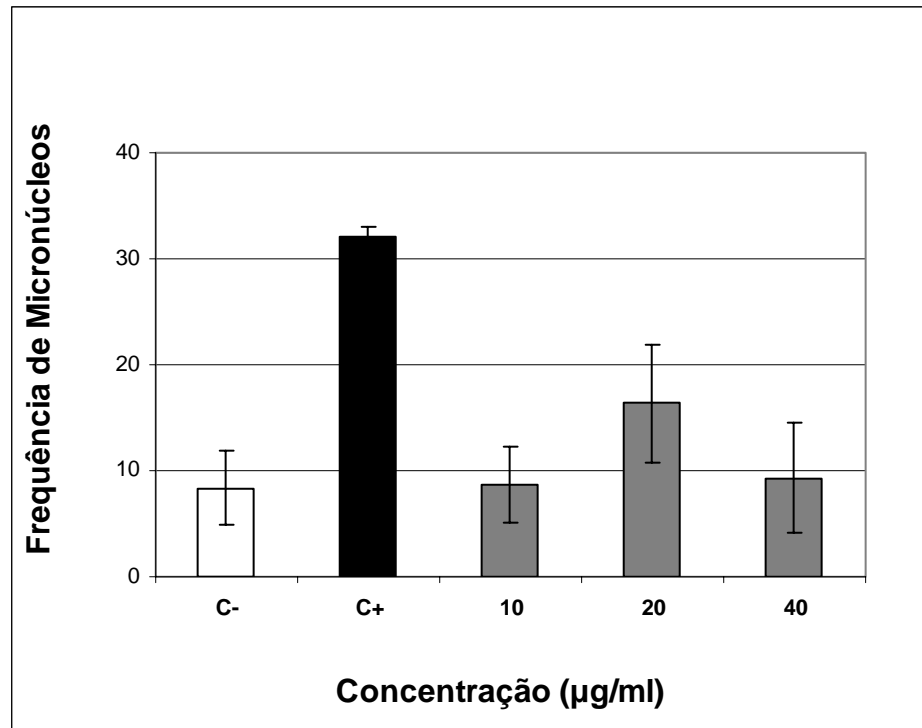


Figura 15: Média da frequência de micronúcleos em Células de Ovário de Hamster (CHO) após tratamento de 20 horas. C- (meio de cultura DEM-F10); C- (doxorrubicina 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 10, 20, e 40 (dietilpropiona a 10, 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meio respectivamente).

Não há diferenças ($P > 0.05$) nos índices de divisão nuclear entre as diferentes concentrações de dietilpropiona e os tratamentos controle negativo e positivo. O mesmo foi observado nas comparações realizadas entre as diferentes concentrações do fármaco (**Figura 16**).

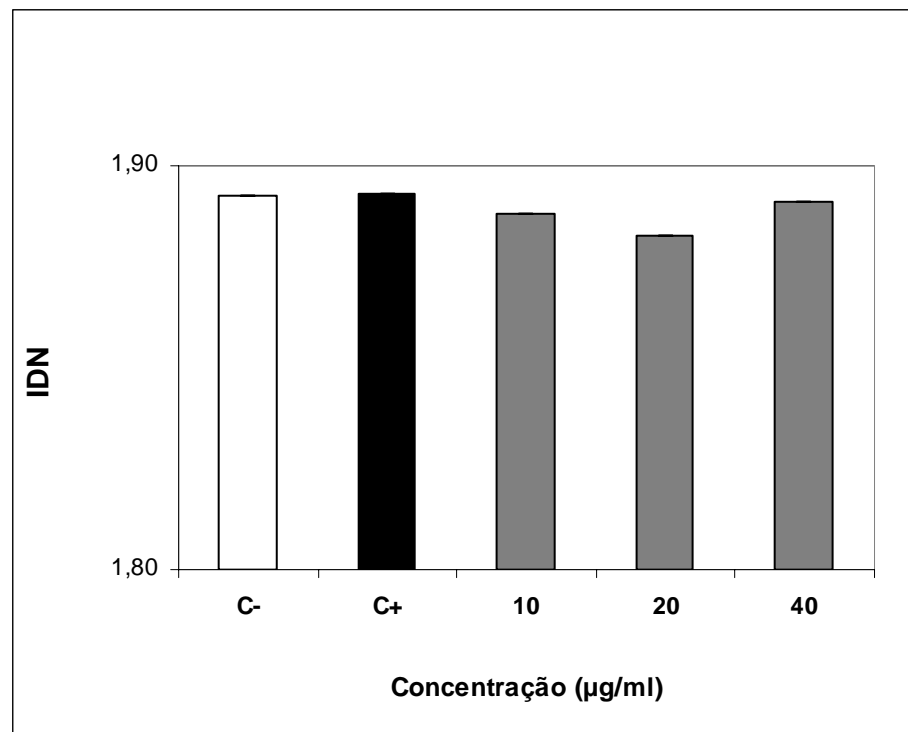


Figura 16: Média do índice de divisão nuclear (IDN) em Células de Ovário de Hamster (CHO) após tratamento de 20 horas. C- (meio de cultura DEM-F10); C+ (doxorubicina 0,15 µg/mL); 10, 20, e 40 (dietilpropiona a 10, 20 e 40 µg/mL de meio respectivamente).

4.4 Teste do Micronúcleo em Linfócitos de Indivíduos Obesos

4.4.1 Avaliação dos fármacos sibutramina e femproporex

Os linfócitos obtidos de indivíduos obesos e expostos *in vitro*, por 24 horas, aos tratamentos com sibutramina ou femproporex, nas diferentes concentrações avaliadas (5,0, 10 e 20 µg/mL de meio), não aumentaram significativamente ($P > 0.05$) os índices de células binucleadas com micronúcleo, quando comparados com o tratamento controle negativo; com exceção do tratamento com sibutramina na dose de 20 µg/mL de meio. Nesta dose o índice de células binucleadas com micronúcleo foi significativamente superior ($P < 0.05$) ao verificado para o controle negativo (**Figura 17**).

Entre as distintas doses do tratamento com sibutramina, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0.05$) entre os índices de células binucleadas com micronúcleo. Nos tratamentos com o femproporex, observou-se resultado similar (**Figura 17**).

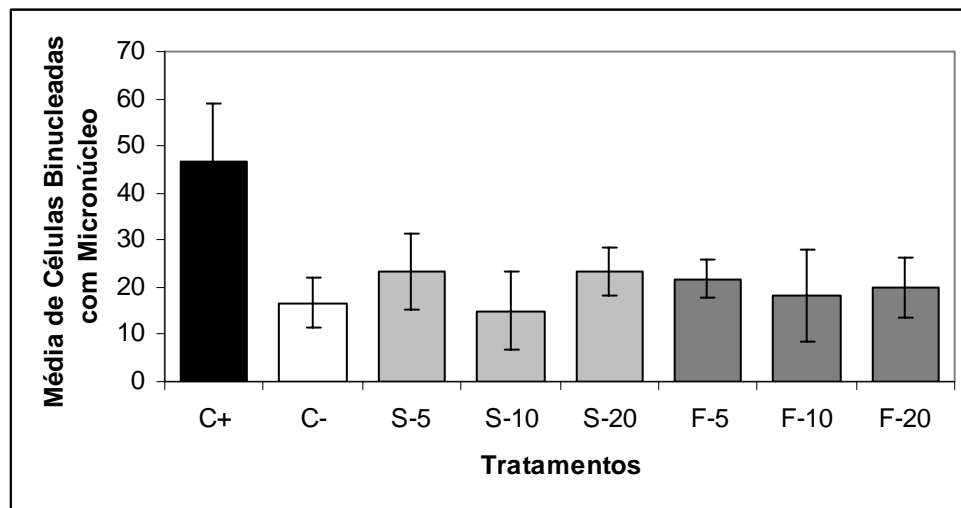


Figura 17: Média da freqüência de linfócitos binucleados com micronúcleo expostos por 24 horas a: C+ doxorubicina (0,02 $\mu\text{g/mL}$ de meio); C- (meio de cultura); S-5 (Sibutramina 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de meio); S-10 (Sibutramina 10 $\mu\text{g/mL}$ de meio); S-20 (Sibutramina 20 $\mu\text{g/mL}$ de meio); F-5 (femproporex 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de meio); F-10 (femproporex 10 $\mu\text{g/mL}$ de meio) e F-20 (femproporex 20 $\mu\text{g/mL}$ de meio).

Não se verificou diferenças nos índices de divisão nuclear nos linfócitos de indivíduos obesos, expostos por 24 horas aos tratamentos com: doxorubicina 0,02 $\mu\text{g/mL}$ de meio, Sibutramina(5,0, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de meio) e femproporex (5,0, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de meio) e controle negativo (meio de cultura) (**Figura 18**).

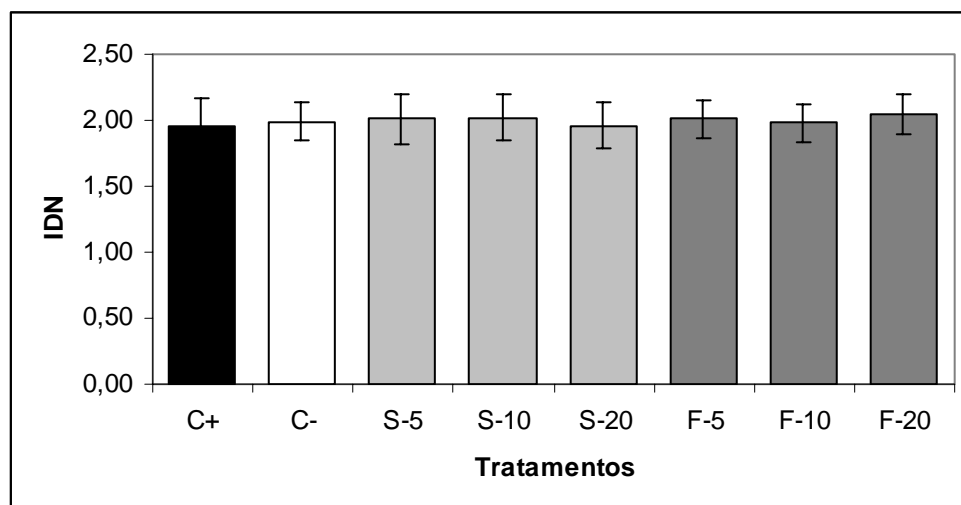


Figura 18: Média do índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos expostos por 24 horas a: C+ (doxorubicina 0,02 $\mu\text{g/mL}$ de meio); C- (meio de cultura); S-5 (Sibutramina 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de meio); S-10 (Sibutramina 10 $\mu\text{g/mL}$ de meio); S-20 (Sibutramina 20 $\mu\text{g/mL}$ de meio); F-5 (femproporex 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de meio); F-10 (femproporex 10 $\mu\text{g/mL}$ de meio) e F-20 (femproporex 20 $\mu\text{g/mL}$ de meio).

4.4.2 Avaliação dos extratos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus*

Ao analisar os linfócitos obtidos de indivíduos obesos, após a exposição por 24 horas, aos extratos hidroalcoólicos de *C. ecalyculata* ou *E. grandiflorus* nas concentrações de 25, 50 e 80 $\mu\text{g/mL}$ de meio de cultura; verifica-se que não há diferenças nos índices de células binucleadas com micronúcleo entre o tratamento controle negativo e as diferentes doses dos tratamentos com os fitoterápicos (**Figura 19**).

Também não verificou variações entre as diferentes doses do mesmo tratamento tanto para *C. ecalyculata* quanto para *E. grandiflorus* (**Figura 19**).

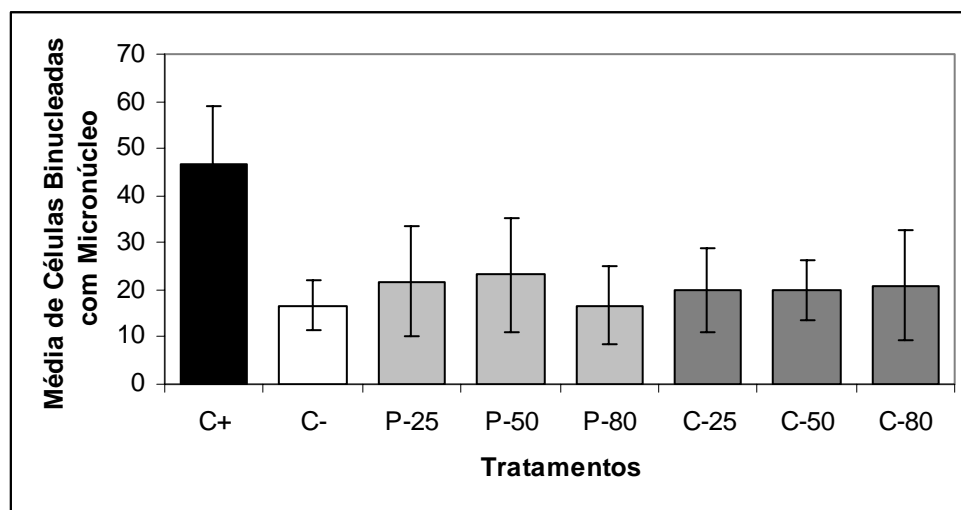


Figura 19: Média da frequência de linfócitos binucleados com micronúcleo expostos por 24 horas a: C+ doxorubicina (0,02 $\mu\text{g/mL}$ de meio); C- (meio de cultura); P-25 (*C. ecalyculata* 25 $\mu\text{g/mL}$ de meio); P-50 (*C. ecalyculata* 50 $\mu\text{g/mL}$ de meio); P-80 (*C. ecalyculata* 80 $\mu\text{g/mL}$ de meio); C-25 (*E. grandiflorus* 25 $\mu\text{g/mL}$ de meio); C-50 (*E. grandiflorus* 50 $\mu\text{g/mL}$ de meio) e C-80 (*E. grandiflorus* 80 $\mu\text{g/mL}$ de meio).

Com relação às possíveis interferências dos extratos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* na divisão nuclear de linfócitos obtidos do sangue venoso de indivíduos obesos. Verifica-se que em todos os tratamentos avaliados, inclusive os controles positivo e negativo, não houve diferenças estatisticamente consideráveis ($P > 0.05$) em termos estatísticos (**Figura 20**).

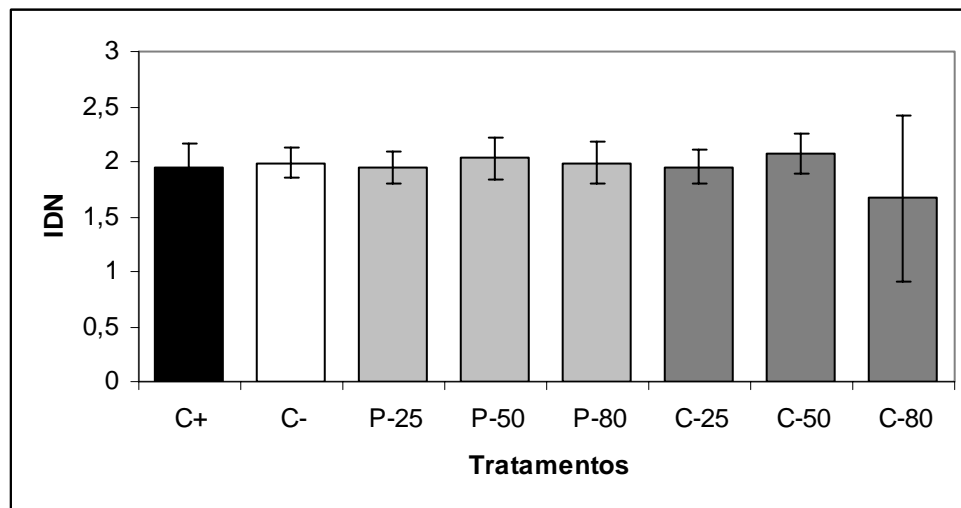


Figura 20: Média do índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos expostos por 24 horas a: C+ doxorubicina (0,02 µg/mL de meio); C- (meio de cultura); P-25 (*C. ecalyculata* 25 µg/mL de meio); P-50 (*C. ecalyculata* 50 µg/mL de meio); P-80 (*C. ecalyculata* 80 µg/mL de meio); C-25 (*E.grandiflorus* 25 µg/mL de meio); C-50 (*E.grandiflorus* 50 µg/mL de meio) e C-80 (*E.grandiflorus* 80 µg/mL de meio).

4.5 Ensaio Cometa

4.5.1 Avaliação do femproporex e sibutramina em sangue periférico de camundongos

Os animais tratados durante 24 horas com o fármaco sibutramina, nas concentrações 10, 20 e 40 mg/kg m.c apresentam escores de danos (ED) no DNA leucocitário significativamente maiores em relação ao controle negativo ($P < 0.05$). No grupo de animais tratados com sibutramina, na concentração de 10 mg/kg m.c, o escore de dano é menor que os grupos tratados com concentrações de 20 mg/kg m.c e 40mg/kg m.c ($P < 0.05$). No grupo tratado com 40 mg/kg m.c de sibutramina foi observado escore de danos significativamente menor que o grupo tratado com 20 mg/kg m.c deste fármaco ($P < 0.05$) (**Tabela 3**).

Os animais tratados durante 24 horas com o fármaco femproporex, nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/kg m.c também apresentaram um aumento significativo no escore de danos no DNA leucocitário quando comparados ao grupo controle negativo ($P < 0.05$) (**Tabela 3**).

O fármaco femproporex também induz um aumento significativo dos escores de danos nas concentrações de 20 mg/kg m.c e 40 mg/kg m.c em comparação com 10 mg/kg m.c ($P < 0.05$) (**Tabela 3**).

Tabela 3: Escore de Dano (ED) no DNA observados em leucócitos de camundongo Swiss 24 horas após os tratamentos.

Tratamentos	Dose	Número de animais	Número de cometas analisados	Escore de danos/100 cometas
Controle negativo (H ₂ O)	10 mL/kg m.c	8	1600	8,500 ± 2,329
Doxorrubicina	5 0 mg/kg m.c	8	1600	62,400 ± 6,346*
Sibutramina	10 mg/kg m.c	6	1200	25,636 ± 2,838*
Sibutramina	20 mg/kg m.c	6	1200	44,600 ± 4,477*
Sibutramina	40 mg/kg m.c	6	1200	37,000 ± 4,295*
Femproporex	10 mg/kg m.c	7	1400	25,400 ± 5,739*
Femproporex	20 mg/kg m.c	7	1400	46,500 ± 5,503*
Femproporex	40 mg/kg m.c	7	1400	49,300 ± 6,391*

*: valores significativamente diferentes do controle negativo ($P < 0.05$) afixado pelo teste t de Student.

Ao avaliar o escore de dano nos grupos tratados com sibutramina e nos grupos tratados com femproporex na concentração de 40 mg/kg m.c, pelos períodos de 3, 24 e 48 horas, observou-se que, para ambos os fármacos, não existe diferença significativa nos escores de danos quando se compara 3 horas e 24 horas ($P > 0.05$). E após 48 horas de tratamento, ocorre redução significativa dos escores de danos, quando comparado com os outros dois períodos (**Figura 21**).

Não foi observada diferença significativa nos escores de danos para o tratamento controle negativo nos períodos de tratamentos de 3 e 48 horas. Para o tratamento controle positivo, o maior escore de dano é observado 24 horas após o tratamento e o menor escore de dano é observado após 48 horas de tratamento ($P < 0.05$) (**Figura 21**).

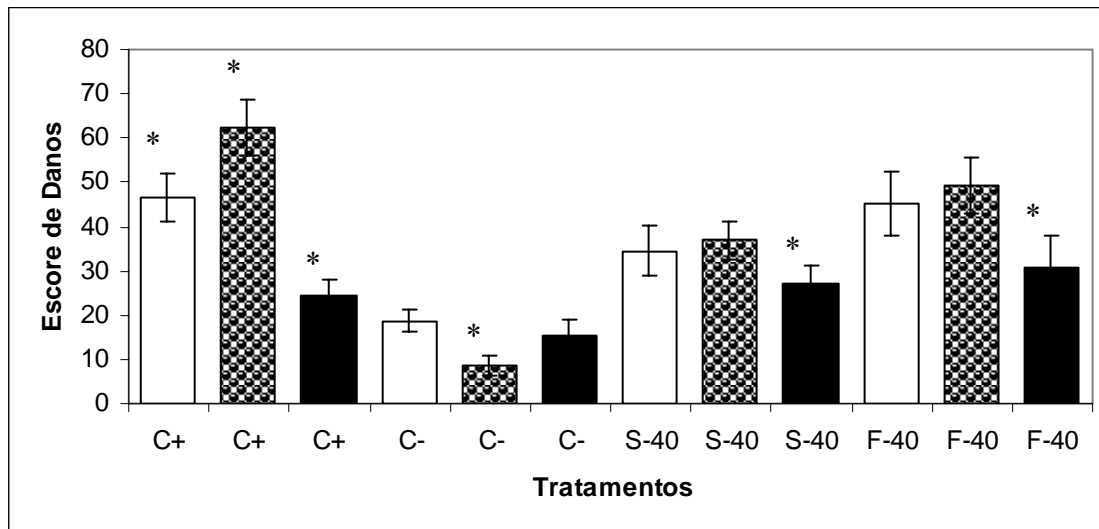


Figura 21: Escore de danos (ED) no DNA leucocitário de camundongo Swiss observados 3 (barra branca) 24 (barra com esfera) e 48 (barra preta) horas após os tratamentos. C+ (doxorubicina 5,0 mg/kg m.c), C- (água destilada), S – 40 (sibutramina a 40 mg/kg m.c), F – 40 (femproporex a 40 mg/kg m.c). As barras estão dispostas na ordem crescente de tempo. Foram analisadas 100 células por animal e 6-8 animais por tratamento.

* Valor significativamente diferente ($P < 0.05$) dentro de cada tratamento comparando os três períodos (3, 24 e 48h) aprofundado pelo teste t de Student.

4.5.2 Avaliação dos extratos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* em sangue periférico de camundongos

Não há diferenças nos escores de danos no DNA ($P > 0.05$) tanto para os tratamentos com *C. ecalyculata* quanto para os tratamentos com *E. grandiflorus* em comparação com o tratamento controle negativo. Também não há diferenças nos escores de danos entre as distintas concentrações dentro dos tratamentos (**Figura22**).

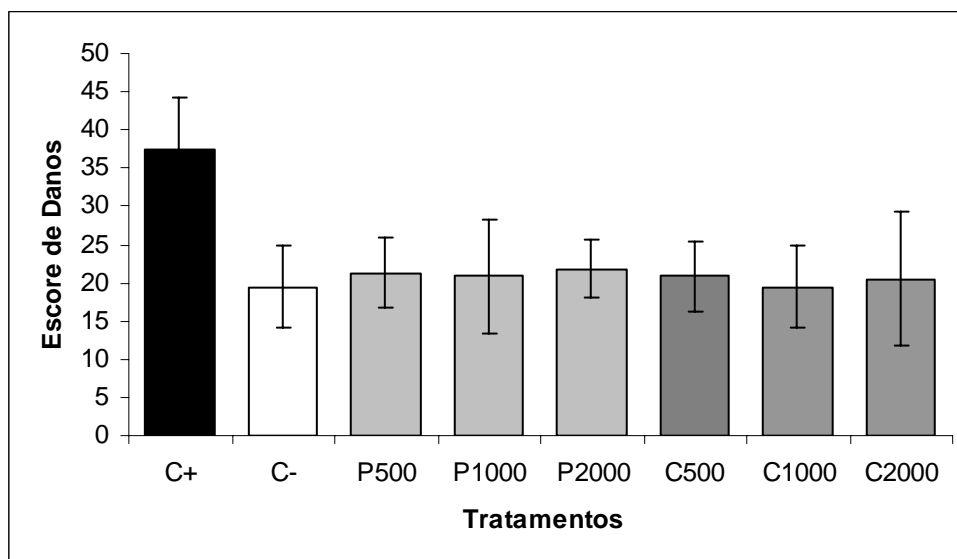


Figura 22: Escores de danos (ED) no DNA leucocitário de camundongo Swiss observados 24 horas após os tratamentos. C+ (doxorubicina 5,0 mg/kg m.c), C- (água destilada), P-500 (*C. ecalyculata* a 500 mg/kg m.c), P-1000 (*C. ecalyculata* a 1000 mg/kg m.c), P-2000 (*C. ecalyculata* a 2000 mg/kg m.c) C-500 (*E. grandiflorus* a 500 mg/kg m.c), C-1000 (*E. grandiflorus* a 1000 mg/kg m.c) e C-2000 (*E. grandiflorus* a 2000 mg/kg m.c). Foram analisadas 50 células por animal e 6 animais em cada tratamento.

4.5.3 Avaliação do femproporex e sibutramina em linfócitos de indivíduos obesos

Ao avaliar a possibilidade de danos genotóxicos em linfócitos obtidos do sangue venoso de indivíduos obesos, expostos *in vitro*, aos fármacos sibutramina ou femproporex obteve-se os seguintes resultados: após 24 horas de tratamento com o fármaco sibutramina nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL os linfócitos apresentaram escore de danos maiores ($P < 0.05$) que o do tratamento controle negativo. Entre as diferentes doses do tratamento com a sibutramina não há variação considerável ($P > 0.05$) nos escores de danos (**Figura 23**).

O fármaco femproporex avaliado nas mesmas condições de tratamento, também apresentou resultado similar ao apresentado pela sibutramina, ou seja, em todas as concentrações avaliadas o escore de danos nos linfócitos foi superior ($P < 0.05$) ao verificado no tratamento controle negativo. Entre as diferentes doses dos tratamentos com femproporex também não há variações consideráveis ($P > 0.05$) no escores de danos (**Figura 23**).

Ao defrontar-se o resultado de escore de danos nos linfócitos avaliados no tempo (T0) com os dos linfócitos do tratamento controle negativo, não se detectou diferença significativa ($P > 0.05$) em termos estatísticos (**Figura 23**).

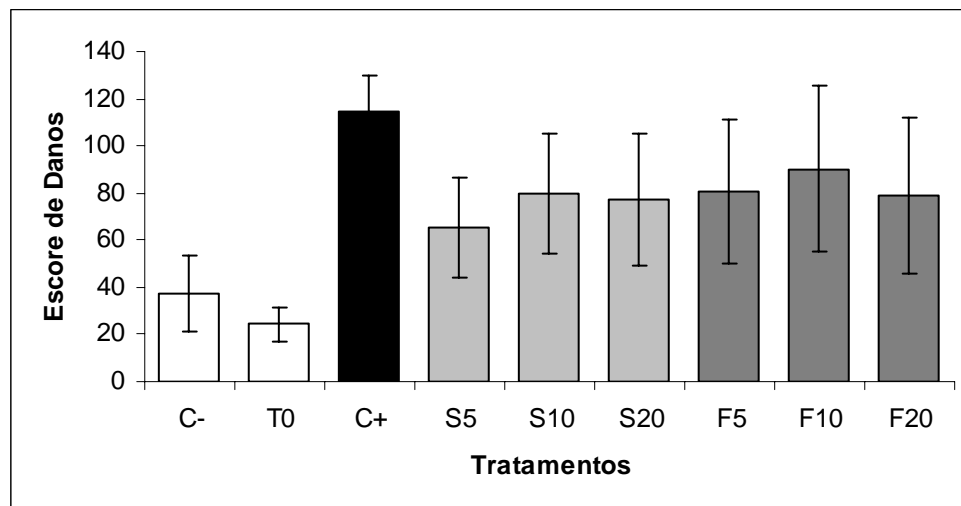


Figura 23: Escore de danos avaliados em linfócitos do sangue venoso de indivíduos obesos após 24 de tratamento. C- (meio de cultura), T0 (Ensaio Cometa feito imediatamente após a colheita do sangue), C+ (doxorubicina 0,02 µg/mL), S5 (sibutramina 5,0 µg/mL), S10 (sibutramina 10 µg/mL), S20 (sibutramina 20 µg/mL), F5 (femproporex 5,0 µg/mL), F10 (femproporex 10 µg/mL) e F20 (femproporex 20 µg/mL).

4.5.4 Avaliação dos extratos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* em linfócitos de indivíduos obesos

Ao avaliar os linfócitos do sangue venoso de indivíduos obesos após 24 horas de tratamento com extrato de *C. ecalyculata* nas concentrações de 25, 50, e 80 µg/mL de meio de cultura, verificou-se pelo Ensaio Cometa que os escores de danos nos tratamentos com as concentrações de 25 e 80 µg/mL não são diferentes em termos estatísticos do escore de danos do tratamento controle negativo. O tratamento com *C. ecalyculata* na concentração de 50 µg/mL apresenta escore de danos nos linfócitos superior ao do tratamento controle negativo. Não há diferenças significantes, em termos estatísticos, entre os escore de danos dos linfócitos tratados com as distintas doses de *C. ecalyculata* avaliadas (**Figura 24**).

Nos tratamentos dos linfócitos com o extrato de *E. grandiflorus* nas concentrações de 50 e 80 µg/mL os escores de danos foram superiores ($P < 0.05$) ao do controle negativo. Na concentração de 25 µg/mL não há diferença ($P > 0.05$). Dentro do tratamento não há diferenças ($P > 0.05$) nos escores de danos entre as três doses avaliadas (**Figura 24**).

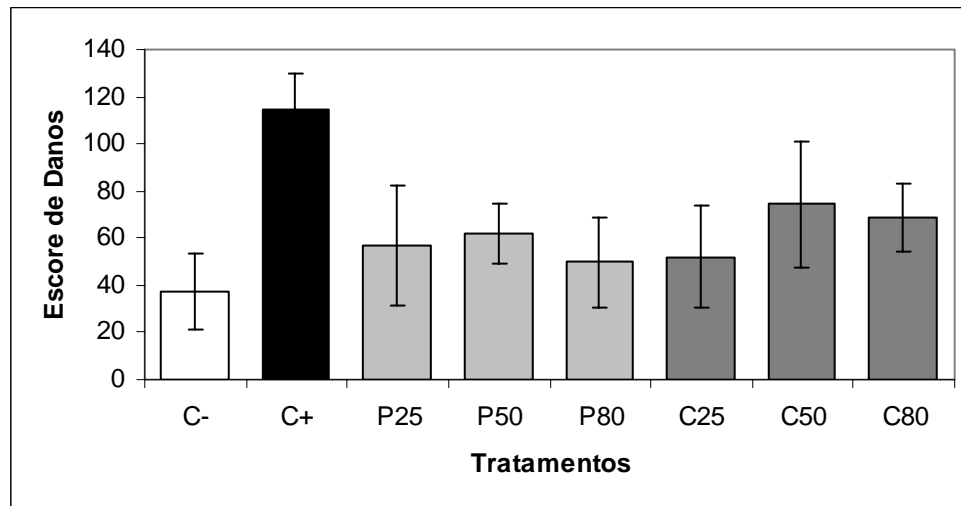


Figura 24: Escore de danos avaliados em linfócitos do sangue venoso de indivíduos obesos após 24 horas de tratamento. C- (meio de cultura), C+ (doxorubicina 0,02 µg/mL), P25 (*C. ecalyculata* 25 µg/mL), P50 (*C. ecalyculata* 50 µg/mL), P80 (*C. ecalyculata* 80 µg/mL), C25 (*E. grandiflorus* 25 µg/mL), C50 (*E. grandiflorus* 50 µg/mL) e C80 (*E. grandiflorus* 80 µg/mL).

4.5.5 Avaliação do fármaco dietilpropiona em cultura de CHO

O tratamento com o controle positivo apresentou escore de danos significativamente diferente ($P < 0.05$) dos demais tratamentos. Comparando o valor do escore de danos do controle negativo com o dos tratamentos com dietilpropiona, nas diferentes concentrações, verificou-se que há diferença significativa apenas entre a concentração de 20 µg/mL de meio de cultura (**Figura 25**). Cabe ressaltar que neste experimento as células foram semeadas e, ao atingirem confluência, foram realizados os tratamentos, sendo estas células analisadas sem descartar o meio de cultura onde elas estavam em proliferação.

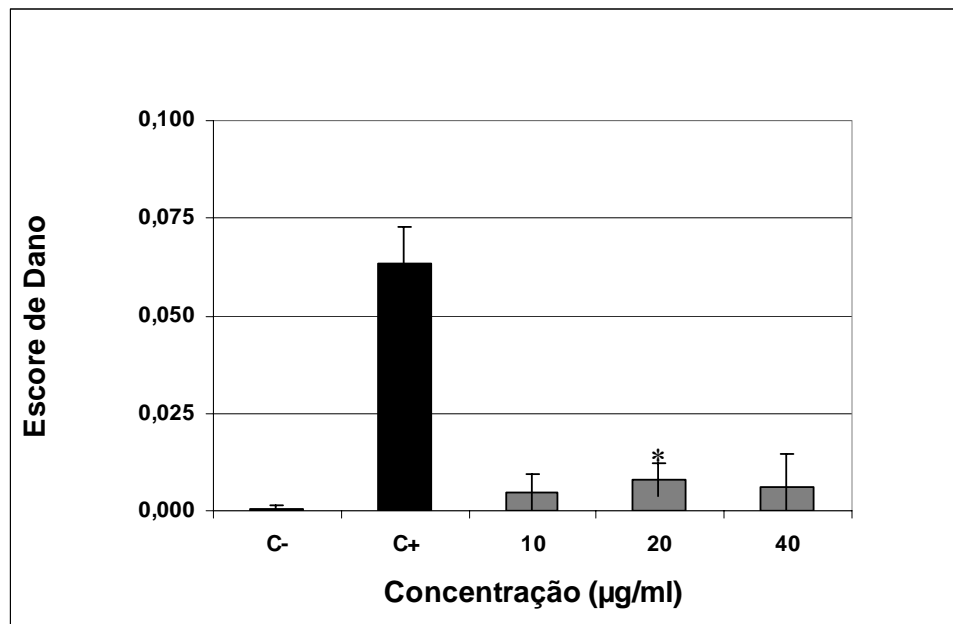


Figura 25: Scores de danos em DNA de Células de Ovário de Hamster (CHO) após tratamento de 20 horas. C- (meio de cultura DEM-F10); C+ (doxorrubicina 0,15 µg/mL); 10, 20, e 40 (dietilpropiona a 10, 20 e 40 µg/mL de meio respectivamente).

* Valor diferente ($P < 0.05$) do controle negativo afiançado pelo teste t de Student.

4.6 Avaliação da Eficácia dos Extratos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus*

Após 15 dias de tratamento com uma dose diária de 2000 mg/kg m.c de extrato de *C. ecalyculata* ou *E. grandiflorus* constatou-se que os fitoterápicos na concentração avaliada não reduziram ($P > 0.05$) o ganho médio de massa corporal, nem o consumo médio de ração dos animais quando comparados com o tratamento controle negativo. O grupo de animais tratados com *E. grandiflorus* apresentou discreto aumento no ganho de massa, enquanto o grupo tratado com *C. ecalyculata* apresentou uma pequena redução no consumo de água (**Figura 26**).

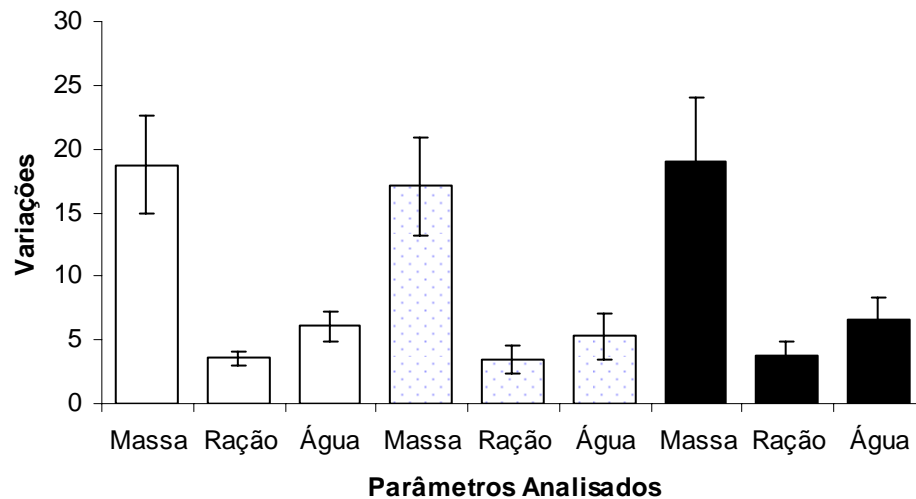


Figura 26: Avaliação da eficácia dos extratos etanólicos de *C. ecalyculata* (barra branca com textura) e *E. grandiflorus* (barra preta) na redução de massa corporal (g), consumo de ração (g) e ingestão de água (mL) em camundongos Swiss tratados por 15 consecutivos com 2000 mg/kg m.c/dia do extrato. O controle negativo tratado com 10 mL/kg m.c de água é representado pelas barras brancas. Cada barra representa o valor médio após os 15 dias de tratamentos.

4.7 Avaliação da Viabilidade Celular para Tratamento CHO com dietilpropiona

Quanto à viabilidade celular constatou-se que em todas as concentrações avaliadas, a dietilpropiona apresenta valores mais elevados ($P < 0.05$) de apoptose quando comparada com o controle negativo. Dentro dos tratamentos com dietilpropiona, não há diferenças ($P > 0.05$) nos índices de apoptose entre tratamentos nas concentrações de 10 e 40 $\mu\text{g/mL}$ e, o tratamento na concentração intermediária (20 $\mu\text{g/mL}$) é ligeiramente menor ($P < 0.05$) que as outras duas (**Figura 27**).

Quanto ao número de células necróticas, não há diferenças ($P > 0.05$) entre as médias dos diferentes tratamentos com dietilpropiona comparados com controle negativo (**Figura 27**).

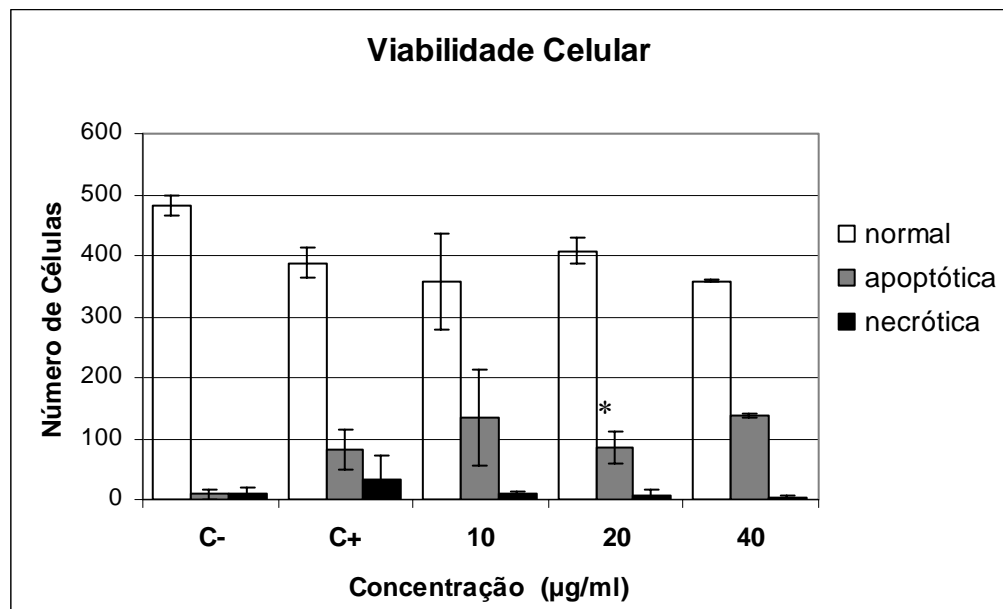


Figura 27: Viabilidade média em células de ovário de hamster (CHO) após tratamento de 20 horas. C- (meio de cultura DEM-F10); C+ (doxorubicina 0,15 µg/mL); 10, 20, e 40 (dietilpropiona a 10, 20 e 40 µg/mL de meio respectivamente). Foram analisadas 500 células por tratamento e 3 experimentos independentes.

* valor diferente dentro do mesmo tratamento ($P < 0.05$) afixado pelo teste t de Student.

5. DISCUSSÃO

5.1 Sibutramina e Femproporex em Camundongo

A sibutramina é uma β -fenetilamina metabolizada no fígado principalmente pela isoenzima CYP3A4. Sua demetilação produz o mono e di-desmetilsibutramina (M_1 e M_2), ambos farmacologicamente ativos. Apresenta rápida e ampla distribuição nos tecidos animais, atingindo os picos plasmáticos 1 - 2 horas (droga) e 3 - 4 horas (metabólitos), e tem meia-vida plasmática de 14 - 16 horas em humanos. Através de estudo em camundongos e ratos, por um período de 2 anos, usando uma dose plasmática dos dois metabólitos, em concentração 21 vezes maior que a dose diária para humanos (20 mg), não foram relatados riscos de carcinogenicidade (Behar, 2002; Collins, 2008; Tice, 2000). Ainda que, alguns serotoninérgicos (Fenfluramina e dexfenfluramina) foram retirados do mercado por produzirem lesões similares a carcinoma (Tice, 1998).

A sibutramina não apresentou mutagenicidade em vários ensaios realizados *in vitro* e com camundongos. No entanto, os dois metabólitos apresentaram resultados ambíguos para atividade mutagênica, em teste bacteriano de Ames (Tice, 2000). O acompanhamento pós-mercado da sibutramina será importante para avaliar sua segurança, pois ela é a primeira droga de sua classe usada para controle de obesidade e normalmente os dados avaliados na época do lançamento de um produto são limitados (Abolfathi *et al.*; 2004; Product Information: Meridia(R), 1999).

Alguns indícios de riscos genotóxicos reforçam a necessidade de intensificar os estudos sobre este fármaco. O FDA não recomenda o uso de sibutramina durante a gravidez. Ramzi *et al.* (2005) descrevem dois casos de uso de sibutramina durante a gravidez, onde uma das mães teve sangramento e a criança foi abortada. Analisando-se a placenta, foram observados sinais de anomalias cromossômicas. Já em ratos não foram encontradas evidências teratogênicas nas doses 1, 3 e 10 mg/dia, entretanto, em coelhos verificou-se malformações cardiovasculares (Physicians Desk Reference (PDR), 2004). Em outro estudo envolvendo 10 parturientes, que tomaram sibutramina durante o primeiro trimestre de gestação, duas tiveram abortos espontâneos (Ramzi *et al.*, 2005). Já De Santis *et al.*, (2006) avaliou 52 mulheres que foram expostas a sibutramina no primeiro trimestre da gravidez e não verificaram nenhum caso de anomalia congênita nos neonatos.

A sibutramina atua inibindo a recaptação de serotonina, noroadrenalina e dopamina provocando redução na ingestão de alimentos, estimulando a termogênese e aumentando o gasto

energético (Kiortsis *et al.*, 2008; Hainer *et al.*, 2006). Em camundongos a sibutramina ativa os B₃ – adrenoceptores que estimula o tecido adiposo a consumir mais glicose, acelerando a taxa metabólica, aumentando a temperatura corporal e o consumo de oxigênio (Luque e Rey, 2002).

O femproporex é um catecolaminérgico baseado na B-fenetilamina (todos anorexígenos de ação central são baseados na B-fenetilamina). O esqueleto B-fenetilamínico também faz parte da estrutura de neurotransmissores como: dopamina, noroepinefrina, e epinefrina. Poucos estudos têm avaliado a segurança dos agentes catecolaminérgicos (Moreira *et al.*, 2005).

O femproporex é metabolizado em anfetamina e metanfetamina. Moreira *et al.*, (2005), verificaram que há escassez de dados experimentais relacionados ao femproporex. Como o camundongo metaboliza o femproporex por vias similares a dos humanos, ele aplicou dose diária de 15 mg/kg m.c neste animal e concluiu que a droga nesta concentração exibe baixo potencial teratogênico (Cody *et al.*, 1999; Kraemer *et al.*, 2004).

A metabolização do femproporex ocorre pela simples e dupla hidroxilação aromática seguida por metilação e degradação de toda cadeia por N-dealquilação para anfetamina. Alcança concentração plasmática em 2 - 4 horas, seu efeito dura de 6 - 8 horas e é eliminada pela urina após 48 horas da ingestão. A anfetamina tem meia-vida de 7 - 14 horas e a metanfetamina de 4 - 5 horas (Kowalowski, 2000; Behar, 2002).

Há evidências de que as anfetaminas induzem efeitos dismorfogênicos no desenvolvimento embrionário de ratos *in vitro*, e também afeta o desenvolvimento embrionário-fetal de camundongos. Em humanos a exposição a anfetaminas durante a gestação está associada a malformações cardíacas congênitas, atresia biliar, e aumenta o risco de ocorrência de fendas palatais, anencefalia, microcefalia, retardo mental, e baixo peso ao nascimento (Cody *et al.*, 1999).

A anfetamina é uma substância simpatomimética relacionada a noroepinefrina. Atua estimulando a liberação de noroepinefrina que estimula os receptores alfa e beta provocando hipertermia e aceleração do metabolismo (Kowalowski, 2000).

A mitocôndria é o maior sítio gerador de ROS (Reactive Oxygen Species) no compartimento celular. Em condições de estresse oxidativo pode provocar necrose e morte celular, doenças degenerativas, hipertensão, envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação, fibrose cística, doença de Parkinson e Alzheimer (Burcham, 1999; Brand *et al.*, 2004; Serviddio *et al.*, 2007). Durante a respiração celular em condições fisiológicas normais elétrons podem

escapar da cadeia respiratória e reagir inapropriadamente com o oxigênio formando ROS (Serviddio *et al.*, 2007). Este escape de elétrons pode ser estimado em 0,5 - 2% em condições fisiológicas, mas pode estar significativamente aumentado em certas condições (Burcham, 1999). Devido às alterações no metabolismo um número considerável de danos no DNA pode ser atribuído à ação de oxidantes endógenos oriundos das vias metabólicas (Lowell e Spiegelman, 2000).

Uma possível explicação para a genotoxicidade destes dois fármacos é por ação indireta através da indução do estresse oxidativo. Estas drogas atuam no sistema nervoso simpático que é o maior componente efetor da termogênese em músculos esqueléticos e tecido adiposo. Em roedores a estimulação do sistema nervoso simpático provoca a liberação de mediadores químicos (noradrenalina) que atuam nos receptores beta adrenérgico do tecido adiposo marrom promovendo a liberação de AMPc que ativa a proteína kinase A que por sua vez fosforila a Perillipina e pode ter efeito agudo, estimulando a lipólise e ativando a UCP1; ou efeito crônico na transcrição de UCP1, biogênese de mitocôndria e hiperplasia de tecido adiposo (Fisher *et al.*, 1998; Nagy *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007). As UCPs são proteínas conhecidas por não acoplar consumo de oxigênio e fosforilação de ADP em tecido adiposo e promover a termogênese. Se os substratos (ácidos graxos e carboidratos) são oxidados e não são produzidos ATP, a cadeia transportadora de elétrons pode ficar em estado reduzido com possibilidade de produzir ROS por transferência de elétrons para o oxigênio. Tem sido postulado que a função das UCP limita a produção de ROS (Diehl e Hoek, 1999; Serviddio *et al.*, 2007; Burcham, 1999; Adler, 1984) ainda que estudos recentes tem afirmado que UCP2 diminui a taxa de ROS dentro da mitocôndria, mas aumenta-o fora (Diehl e Hoek, 1999).

Estas drogas promovem aumento do metabolismo por meio da elevação de íon cálcio (Ca^{2+}). No meio intracelular e o cálcio otimiza a atividade de algumas enzimas que participam do ciclo do ácido cítrico (Brand *et al.*, 2004). Há aumento na formação de ROS que normalmente são detoxificados por um eficiente sistema antioxidante. Um desequilíbrio entre a geração de ROS e a detoxificação, em condições não fisiológicas pode resultar no estresse oxidativo (Brand *et al.*, 2004). Mitocôndrias isoladas de camundongos em restrição calórica (baixo metabolismo) podem reduzir a taxa metabólica em até 40%, e produz menos ROS que os controles. Esta diminuição de ROS está correlacionada com a diminuição de danos oxidativos em tecidos de camundongos (Serviddio *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007). Amparando-nos nestas observações

podemos sugerir que os danos genotóxicos causados por sibutramina e femproporex são resultantes de suas ações no sistema nervoso simpático desencadeando alterações no metabolismo oxidativo que rompe o equilíbrio entre a geração de ROS e a detoxificação, possibilitando a ligação de radicais livres com macromoléculas vitais como proteínas e DNA. Estudos quantitativos de ROS em animais tratados com estes fármacos poderão esclarecer melhor a questão.

A relação entre PCE/NCE verificada em eritrócitos da medula óssea possibilita estimar o índice de toxicidade das substâncias testes neste tecido. A razão PCE/NCE com valor acima de 1,0 e abaixo de 0,5 revelam problemas de citotoxicidade que podem ou não ser genotóxicos (Mavournin *et al.*, 1990; Gollapudi e McFadden, 1995) Redução na proporção de eritrócito imaturo sobre total de eritrócito tanto na medula quanto em sangue periférico são indicativos de toxicidade na medula óssea (Aleisa *et al.*, 2007) Já Adler (1984), propôs uma relação esperada de 1:1 entre PCE/NCE e recomenda evitar condução de experimento onde razão PCE/NCE for menor que 25%. Gollapudi e McFadden, (1995) estimaram uma frequência esperada de 50-60% de PCE entre o total de eritrócitos da medula óssea.

Em nosso trabalho todos os valores estão acima de 1,0 o que nos permite deduzir que as substâncias em teste estão provocando uma hiperproliferação de PCE ou uma destruição de NCE. Como o controle negativo (água) também possui valor acima de 1,0 tal dedução fica prejudicada. Adler, (1984) faz a seguinte advertência: se por um lado o aumento de NCE pode significar efeitos citotóxicos (morte das células jovens ou depressão da proliferação da medula), por outro o aumento de PCE pode significar uma proliferação regenerativa devido à depressão medular anterior. Como nosso tratamento é agudo e trabalhamos com animais provindo de biotério confiável esta última hipótese não é elucidativa deste aumento na razão PCE/NCE, ainda que as drogas testadas possam interferir nos mecanismos hematopoiéticos provocando proliferação. No trabalho de Bueno e Agostini, (2001) verificou-se situação semelhante. O controle positivo apresenta um valor de razão PCE/NCE duas vezes maior que o controle negativo como não se espera que isto decorra de uma resposta regenerativa, pois o tratamento é agudo, e sim de uma depressão medular eles suspeitaram que houvesse irregularidade da função eritropoiética da medula óssea dos animais do biotério e que tornaria mais pronunciada com o aumento da toxicidade local por exposição à droga. Em nosso estudo não verificamos diferença entre os controles positivo e negativo, mas a quantidade de MNPCE no controle positivo é mais de 5

vezes maior que a do controle negativo indicando o efeito da atuação da droga na medula. Como todos os valores da razão PCE/NCE são superiores ao do controle negativo podemos sugerir que as drogas estejam destruindo NCE e/ou estimulando a proliferação medular justificando estas diferenças. As diferenças não são tão pronunciadas devido ao curto tempo de exposição. Comparando os tratamentos de 24 horas e 48 horas para doxorrubicina os valores permaneceram iguais o que pode ser justificado pela permanência do efeito desta droga que tem meia vida longa; com as outras drogas houve redução o que está de acordo com ausência do estímulo devido suas curtas meias vidas (Udroiu, 2006). O período que deve transcorrer entre a absorção pelo camundongo de um agente mutagênico, sua metabolização, complementação dos estágios finais do ciclo de divisão, eliminação do núcleo do eritroblasto, e o aparecimento dos micronúcleos no PCE da medula óssea, é no mínimo de 6 horas, incluindo os atrasos que podem ocorrer no ciclo de divisão. Cerca de 12-24 horas depois da absorção os PCEs presentes na medula óssea correspondem aos descendentes das células que foram expostas ao agente antes da divisão celular enquanto os PCEs pré-existentes se movem para a circulação periférica e se transforma em NCE. De acordo com Krishna e Hayashi (2000), a toxicidade medular é assegurada por redução de PCEs nos tratamentos em relação ao controle negativo. Tal fenômeno não ocorreu notando-se, ainda que pequeno, aumento nas razões PCE/NCE nos tratamentos. Apoiado nesta premissa podemos deduzir que as substâncias testadas não reduzem o número de PCEs na medula de camundongo nestas condições de teste.

Nos tratamentos com Doxorrubicina a frequência de MNPCE e MNNCE aumenta no decorrer do tempo. A maior elevação de MNPCE ocorre após 48 horas do tratamento e de MNNCE após 72 horas (Aleisa, *et al.*, 2007). O Teste do Micronúcleo tem um importante papel no processo regulatório do desenvolvimento de uma droga. Avaliação da frequência de micronúcleo *in vivo* é um teste primário da bateria de testes genotóxicos recomendados por agências reguladoras em todo o mundo para avaliar possíveis riscos de fármacos para os seres humanos. O teste detecta efeitos clastogênico e aneugênico (Krishna e Hayashi, 2000; ICH, 2008). Quando comparamos o número médio de hemácias micronucleadas no sangue periférico de animais tratados com sibutramina e de animais tratados com femproporex, na concentração de 40 mg/kg m.c, nos períodos de 24 e 48 horas constatamos que para as duas drogas houve o mesmo comportamento, ou seja houve diminuição da média de hemácias micronucleadas após 48 horas do tratamento quando comparado com a análise realizada após 24 horas. O controle

positivo teve também este comportamento. Aleisa, *et al* (2007) verificou pico máximo de MNNCE após 72 horas do tratamento com doxorubicina; já no controle negativo o número médio de hemácias micronucleadas permanece o mesmo. O que nos leva a crer que as drogas nestas concentrações produzem danos irreparáveis e algumas células muito danificadas são retiradas da circulação. No compartimento medular o comportamento é similar, há uma redução da frequência de MNPCE após 48 horas do tratamento, o que pode ser justificado pela destruição dos eritrócitos muito danificados ou por diminuição da concentração das drogas no compartimento e conseqüente redução na indução de danos genéticos. Com o controle positivo verifica-se o contrário, ou seja, uma discreta elevação de MNPCE após 48 horas do tratamento o que se justifica pela maior permanência da doxorubicina no organismo quando comparado com a sibutramina e femproporex. Aleisa, *et al* (2007) também verificou isto com doxorubicina 5mg/Kg m.c, e verificou o contrário para doxorubicina a 15mg/Kg m.c em roedores.

O nível de produção contínua de PCEMN e NCEMN depende da persistência do agente, das lesões no DNA, das taxas combinadas de formação e perdas, de aberrações cromossômicas e da taxa de recuperação do ciclo celular. Havendo a interrupção da ação do agente a frequência de PCEMN voltará a taxa anterior. O tempo estimado para que estabeleça uma frequência de equilíbrio para PCEMN na medula óssea e sangue periférico de camundongo é de dois e três dias respectivamente depois do tratamento com agente mutagênico (Cole, 1981).

Estudos adicionais comparando a frequência de eritrócitos micronucleados de sangue periférico e medula óssea com exposição crônica (e espontânea) mostram que eritrócitos micronucleados acumulam no sangue periférico independente da interferência do baço. Entretanto a frequência no sangue periférico é igual ou maior que na medula óssea (Udroiu, 2006). O baço de várias espécies remove o eritrócito micronucleado circulante. Apesar de algumas discordâncias, animais como camundongos, cavalos e felinos são tidos como tolerantes a presença de eritrócitos micronucleados na circulação; a permanência ou não de eritrócitos micronucleados no sangue periférico é atribuída a variação anatômica presente no baço destes animais (Udroiu, 2006). O uso de eritrócitos de medula óssea para testes detecta somente danos genotóxicos recentes, enquanto medida de micronúcleos em sangue periférico, devido à longa vida do eritrócito, potencialmente pode avaliar efeito de exposição crônica (Schlegel e MacGregor, 1982).

No teste de micronúcleo para medula de 24 horas, verificamos que tanto a sibutramina quanto o femproporex aumentam os danos clastogênicos e/ou aneugênicos em relação ao aumento das doses e Krishna and Hayashi, (2000) afirmam que um critério para um resultado positivo pode ser o aumento de MNPCE relacionado ao aumento de dose. Suter *et al.*, (2006) considera o tratamento positivo se a percentagem de MNPCE for 20% superior a do controle negativo.

Verificamos que no compartimento medular, para este período, as frequências de PCEMN são menores que as de MNCE no sangue periférico exceto para o controle positivo onde o número de NNCE no sangue periférico é menor o que também foi observado por Udroui, (2006). A explicação para o comportamento do controle positivo pode ser a mesma dada por Bueno e Agostini, (2001), ou seja, um elevado número de células muito danificadas pelos eventuais agentes genotóxicos e/ou citotóxicos, acabaria morrendo.

O ensaio cometa em sua versão alcalina é muito sensível na detecção de danos (quebras no DNA e sítios álcalis lábeis) e reparo no DNA. Como o dano no DNA ou falha no reparo leva a mutação e mutações são importantes no desenvolvimento de carcinogênese estas informações são bastante úteis (Wasson *et al.*, 2008; McKenna *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2008), apesar de não haver evidências que alto nível de danos em glóbulos brancos reflita em elevação do risco de câncer (Dusinska e Collins 2008).

O Ensaio Cometa detecta danos primários no DNA, muitas vezes reparáveis, enquanto o teste do micronúcleo detecta lesões fixas nos cromossomos ou efeitos aneugênicos (Hartmann *et al.*, 2001). Analisando os resultados do Ensaio Cometa para sibutramina e femproporex na concentração de 40 mg/kg m.c nos períodos de 3, 24, e 48 horas após o tratamento não verificamos diferenças nos índices de danos entre o período de 3 e 24 horas o que possibilita afirmar que não houve reparo dos danos provocados pelos fármacos nesta concentração, no DNA dos leucócitos de camundongo. O dano não reparável pode ser o passo inicial da tumorigênese. No período de 48 horas houve redução do índice de dano (também expresso por score de danos), para ambos os fármacos o que é explicado por uma diminuição da concentração plasmática dos fármacos e como consequência a diminuição do estímulo gerador dos danos, ou também pela eliminação de células muito danificadas.

Nos resultados dos tratamentos de 24 horas a sibutramina demonstra relação dose-efeito para as concentrações de 10 e 20 mg. Para a concentração de 40 mg há redução no índice de

danos no DNA, o que pode ser explicado por eliminação de células muito danificadas, ou seja, nesta concentração a droga produz mais danos que impossibilita a sobrevivência de algumas células. Comportamento semelhante ocorre para o femproporex onde se observa uma aproximação dos índices de danos entre as concentrações de 20 e 40 mg. A explicação para este comportamento pode ser a mesma usada para sibutramina.

Se levarmos em consideração a “Human Equivalent Dose” (HED), em nosso estudo trabalhamos com doses que variam de 1,5 a 6,5 e 1,2 a 4,85 vezes maiores que a dose prescrita para humanos, respectivamente para sibutramina e femproporex (Shaw-Reagan *et al.*, 2007). De modo que nas condições e metodologia deste estudo tanto a sibutramina quanto o femproporex aumenta a frequência de danos genéticos em células hematopoiéticas de camundongos Swiss quando comparado com o controle negativo. Devido ao elevado consumo destes fármacos em todo o mundo e suas importâncias em saúde pública, nós recomendamos a continuação dos estudos no sentido de determinar os mecanismos de produção dos danos genéticos e também recomendamos o uso de antioxidantes associados a terapias com estas drogas.

5.2 *C.ecalyculata* e *E.grandiflorus* em Camundongo

As frequências de hemácias micronucleadas após os tratamentos com os extratos dos fitoterápicos *C.ecalyculata* e *E.grandiflorus* por 24 horas, são maiores que a do controle negativo, mas a magnitude destas diferenças e a ausência de dose-resposta permite-nos desconsiderar sua significância, pois de acordo com Guidelines for the Testing of Chemical, (OECD)-Guideline 476, 1997; para considerar como positivo um resultado de ensaio genotóxico o valor dos testes devem ser maiores que o controle negativo e deve haver variações nas respostas à diferentes doses da substância teste. Ainda quanto a este resultado a elevação de hemácias micronucleadas no sangue periférico quando comparada com os PCEs medulares é esperada, pois segundo Udroui (2006) o camundongo não remove as hemácias micronucleadas do sangue periférico. Na medula óssea não verificamos variações estatisticamente significativas ($P < .05$) entre MNPCE dos grupos tratados com os extratos dos fitoterápicos *C.ecalyculata* e *E.grandiflorus* por 24 horas e, por 15 dias; se comparados com o grupo controle negativo. Krishna e Hayashi (2000), afirmam que um critério para dizer que um resultado é positivo pode ser o aumento de MNPCE relacionado ao aumento de dose, isto não foi verificado em nosso estudo. Konan *et al.*, (2007), trabalhando com extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale*, espécie que apresenta perfil

fitoquímico semelhante *C. ecalyculata*, ministrando uma concentração de 2000 mg/kg m.c de camundongo, verificou aumento significativo ($P < .05$) de MNPCes em relação ao controle negativo. A não observação de resultado semelhante em nosso trabalho pode ser devido a diferenças nas concentrações das frações constituintes do extrato.

O aumento significativo de hemácias micronucleadas no sangue periférico tanto após 24 horas quanto após 15 dias de tratamento e a não verificação de alterações significativas nas frequências de MNPCes na medula óssea para esses mesmos períodos pode ser devido a fraca ação clastogênica de alguma substância componente dos extratos o que provocaria um discreto aumento do número de MNPCes na medula mas como em camundongos não ocorre destruição dos MNPCes estes acumulariam no sangue periférico. Witt *et al.*, (2000), verificaram resultado semelhante em camundongos submetidos a tratamento agudo (por 3 dias) e crônico (por 13 semanas) com 3,3',4,4'-Tetracloroazobenzeno (TCAB) e 3,3',4,4'-tetracloroazoxibenzeno (TCAOB)

Os extratos dos fitoterápicos *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* não aumentam o escore de danos em DNA leucocitário de camundongo Swiss em comparação com o tratamento controle negativo. Lopes *et al.*, (2000), também verificaram resultado semelhante em células sanguíneas, células do fígado e células do rim tratadas com extrato de *Echinodorus macrophyllus*, ainda que, usando alta concentração, verificou-se apenas fraca atividade genotóxica. A ausência de danos genotóxicos pode ser atribuída ao predomínio de substâncias antioxidantes nos extratos. Tanto o extrato de *C. ecalyculata* quanto o de *E. grandiflorus* contêm saponinas, esteóides e flavonóides, substâncias avaliadas com potencial antígeno-tóxico e antioxidante (Zhang *et al.*, 2008; Ahmadi, *et al.*, 2008; Utescha *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

Quanto à eficácia para tratamento ou controle de obesidade verificamos que os animais tratados com *E. grandiflorus* (chapéu-de-couro) tiveram uma discreta elevação no consumo de água o que pode ser associado a possível efeito diurético deste fitoterápico. Cardoso *et al.*, (2003), verificaram que o extrato aquoso deste fitoterápico à 5% apresentou potente atividade diurética em camundongos Swiss. Esta propriedade possivelmente é que leva a população a usá-la crendo ser redutor de massa corporal. Nas condições do nosso experimento o extrato hidroetanólico não reduziu a ingestão de alimento nem a massa corporal dos animais tratados. Ao contrário, houve um discreto aumento da massa corporal. Lopes *et al.*, (2000) observou que o extrato aquoso liofilizado de *Echinodorus macrophyllus* em baixa concentração (3-23 mg/kg m.c)

reduz a massa corporal em valores superiores a 40% em comparação com o controle negativo. Já em altas doses (297 mg/kg m.c) a redução foi apenas de 5%. Outra possível explicação para nosso resultado pode ser que trabalhamos com uma alta dose (2000 mg/kg m.c) ou o *E. grandiflorus* não contém algumas substâncias presentes em *E. macrophyllus* que interfere nos mecanismos fisiológicos relacionados ao controle da massa corporal. O *E. macrophyllus* não apresentou efeito mutagênico, citotóxico ou genotóxico Lopes *et al.*, (2000).

Para *C. ecalyculata* também contrário à crença popular não observamos eficácia na redução da massa corporal, ingestão de alimento e água. Siqueira *et al.*, (2006), trabalhando com uma concentração de 20 mg/kg mc por 13 dias também verificaram resultado semelhante em ratos.

Nos testes citotóxicos não verificamos reduções estatisticamente significativas de PCEs entre os tratamentos e o controle negativo tanto para os tratamento agudos (24 horas) quanto para os tratamentos crônicos (15 dias). Verificamos discreto aumento na razão PCE/NCE quando comparado com o controle negativo para os grupos tratados (24 horas) com *C. ecalyculata* (1000 mg e 2000 mg/kg mc). Apesar de Rapisarda *et al.*, (1997), terem verificado efeito citotóxico em outras espécies de *Cordia* em tratamento crônico, fato atribuído por eles à presença de alcalóides pirrolizidina nestas espécies. O mesmo não foi detectado em *C. ecalyculata*. O extrato metanólico de folhas de *Cordia salicifolia* apresenta atividade citotóxica contra células de tumores. (Arisawa *et al.*, 1994). Caparroz-Assef *et al.*, (2005) afirmaram após estudos toxicológicos que o extrato da *Cordia salicifolia* possui baixo potencial toxicológico e não encontraram evidências de risco depois de prolongada exposição à dose usual.

A elevação da razão PCE/NCE pode ser devido ao aumento da proliferação de PCEs ou a redução de NCE. Redução na proporção de eritrócitos imaturos em relação ao total de eritrócitos, tanto na medula quanto em sangue periférico, são indicativos de toxicidade na medula óssea (OECD-Guideline 474, 1997). Adler, (1984), propôs uma relação esperada de 1:1 entre PCE/NCE, e recomenda evitar condução de experimento onde razão PCE/NCE for menor que 25%. Gollapudi e McFadden, (1995), estimaram uma frequência esperada de 50 a 60% de PCE entre o total de eritrócitos da medula óssea. Em nosso estudo todos os valores estão acima de 1,0, o que nos permite deduzir que as substâncias testadas estão provocando uma hiperproliferação de PCE ou uma destruição de NCE. Como o tratamento controle negativo (água) também possui valor acima de 1,0, tal dedução fica prejudicada.

De posse dos dados desta pesquisa podemos concluir que os extratos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* nas doses e regime terapêutico avaliadas não possuem atividade clastogênica nem citotóxica para PCE de camundongos Swiss (tanto para tratamento de 24 horas quanto para 15 dias);verificado no sangue periférico. Podemos concluir também que os extratos não apresentaram eficácia para tratamento de obesidade e não apresentaram atividade genotóxica (24 horas). Devido ao uso extensivo deste recurso natural e seu potencial terapêutico sugerimos a continuidade dos estudos com cada fração componentes dos extratos.

5.3 Dietilpropiona em Cultura de CHO

O fármaco dietilpropiona induz a liberação e inibe a recaptação de dopamina e noradrenalina pelos terminais neuronais. O dietilpropiona a semelhança do femproporex possui a mesma estrutura feniletilamina encontrada na anfetamina (Nappo, 1996).

O fármaco dietilpropiona é rapidamente absorvido no trato digestório e extensivamente metabolizado em 2-etilamino-1-fenil-propan-1-ona e N,N-dietilnorofedrina que é excretada quase que exclusivamente via renal. Em trabalho realizado por Han Yu *et al.*, (2000) para verificar a atividade fisiológica da dietilpropiona, constatou-se que ela é uma pró-droga inativa tanto na liberação quanto na captação das aminas biogênicas. Os resultados indicaram que o metabólito 2-etilamino-1-fenil-propan-1-ona é o responsável pelos seus efeitos biológicos. Outro aspecto interessante deste estudo é que este metabólito é um substrato para o transportador de noroepinefrina (NE) e um inibidor da captação para transportador de dopamina (DA). Esta observação sugere que nas doses terapêuticas a dietilpropiona está ligada ao aumento da noroepinefrina no cérebro e não de dopamina (HanYu *et al.*, 2000). Por utilizarmos sistema *in vitro* e não termos possibilidades de certificar se houve metabolização do fármaco pelo sistema celular que nós utilizamos interpretamos com cautela nossos dados e sugerimos o estudo *in vivo* para melhor elucidção.

Ao avaliar por meio do Ensaio Cometa os possíveis danos no DNA deparou-se com o seguinte comportamento, o score de danos nas células que receberam a concentração intermediária de dietilpropiona (20 µg/mL) é mais elevado que nas que receberam a inferior e a superior. Uma possível explicação para este comportamento é que nesta concentração há um equilíbrio entre interiorização da droga e morte celular. Nesta concentração a célula consegue interiorizar a droga e permanecer viável possibilitando que o fármaco (ou seus metabólitos) atinja

o núcleo e interfira na atividade do DNA. Na concentração mais baixa (10 µg/mL) a possível explicação é que o fármaco exerça uma fraca ação genotóxica direta e ele não atinge dose efetiva para elevar consideravelmente o escore de danos no DNA. Para a concentração superior (40 µg/mL) o fármaco pode estar destruindo as células ou saturando os transportadores de membrana impedindo a sua interiorização.

Na avaliação de danos no DNA dos nucleóides de células CHO pelo Ensaio Cometa não computamos os nucleóides com sinais de apoptose e necrose. Quando a célula está em processo de apoptose o DNA sofre fragmentação e formam cometas com migração de todos os fragmentos de DNA para a cauda sendo denominados de cometa na forma de ouriço ou fantasmas (Collins *et al.*, 2008).

Galvan-Arzate e Santamaría (2002), estudando o efeito da Dietilpropiona ministrada na concentração de 5 mg/kg em ratos, durante 15 dias consecutivos constatou que além dos efeitos citotóxicos e excitotóxicos ocorriam formação de radicais livres e stress oxidativo. Verificaram que em determinadas áreas do SNC (hipocampus) a peroxidação lipídica aumentou em até 75% em relação ao controle.

O estresse oxidativo é uma cadeia de eventos danosos que leva a morte celular. Normalmente é precedido por uma cascata de insultos tóxicos. A peroxidação lipídica é uma das expressões do estresse oxidativo; envolve a reação direta de radicais livres derivados do oxigênio ou do nitrogênio com os lipídios da membrana para gerar radicais intermediários e peróxidos semi-estáveis. A peroxidação lipídica é danosa para célula devido as subseqüentes cadeias de reações produzidas pelos radicais livres nos substratos biológicos (Galvan-Arzate e Santamaría, 2002).

Não é surpresa encontrar aumentada a taxa de peroxidação lipídica em algumas regiões do cérebro após a administração de dietilpropiona, pois tem sido demonstrado que outros derivados de anfetamina, como as metanfetaminas envolvem a produção de radicais livres em seu mecanismo tóxico. Estes achados sugerem que durante a toxicidade provocada pelas anfetaminas, a produção de radicais livres e o dano oxidativo podem gerar o processo geral de danos (Galvan-Arzate e Santamaría, 2002).

A fraca ação genotóxica verificada em nosso estudo deve-se possivelmente ao fato de que nas condições de cultura não há produção das neuroaminas que aceleram o metabolismo celular produzindo excesso de radicais livres e, conseqüentemente intensificando os danos nas

macromoléculas biológicas. Desta forma os danos verificados devem-se possivelmente a ação direta do fármaco nas condições de cultura. Como a ação biológica da dietilpropiona *in vivo* é por intermédio do aumento de noroepinefrina e segundo estudo realizado por Mao *et al.*, (2006) o neurotransmissor noroepinefrina, em concentrações elevadas, causa danos em vários componentes celulares via produção de radicais livres. Eles afirmam que a noroepinefrina causa apoptose em vários tipos celulares entre eles estão os neurônios e células do miocárdio. O estresse oxidativo ainda causa alterações no retículo endoplasmático que pode resultar na morte celular.

Quanto aos possíveis efeitos clastogênicos/aneugênicos da dietilpropiona os dados também permitem-nos sugerir uma fraca ação direta. Similarmente ao que aconteceu com o índice de danos. A frequência média de células micronucleadas é superior na concentração intermediária (20 µg/mL) a explicação possível é que nesta dose o fármaco atinge o pico ótimo de absorção celular interferindo com mais efetividade nos mecanismos de duplicação e segregação dos cromossomos. Apesar de haver esta elevação na fixação de danos nesta dose não há uma correlação dose resposta e também não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com o fármaco e o controle negativo. Sendo estes dois fatores importantes parâmetros para interpretação do efeito genotóxico positivo pelo pesquisador, interpretamos com cautela nossos resultados e sugerimos uma fraca ação genotóxica para o fármaco neste tratamento *in vitro*, pois nem sempre o que é positivo *in vitro* representa risco *in vivo*.

A verificação de danos pelo ensaio cometa e a não confirmação pelo teste do micronúcleo pode ser interpretado devido ao fato da maioria das lesões que danificam o DNA serem transitórias e podem ser reparadas (Dusinska e Collins, 2008; Collins *et al.*, 2008).

Os testes *in vitro* usados isoladamente servem apenas com indicativos para caracterização de riscos. Quando associados aos outros testes toxicológicos torna-se uma importante ferramenta de aplicação no campo de citotoxicidade e genotoxicidade. São testes de menor custo que podem ser feitos rapidamente permitindo selecionar vários compostos para estudos detalhados. A limitação dos testes *in vitro* deve-se: não avaliação de células ou tecidos de todos os órgãos, não é possível avaliar a cinética sistêmica (absorção, penetração, distribuição e excreção), não permite verificar uma ação integral dos vários sistemas orgânicos sobre os efeitos do fármaco, as propriedades físico-químicas do composto podem dificultar o teste. Mesmo diante de todas estas

dificuldades os testes *in vitro* são universalmente usados e aceitos para compor a bateria de testes genotóxicos/citotóxicos (Huggett *et al.*, 1996).

A morte celular programada também denominada de apoptose ocorre em várias situações patológicas e durante o desenvolvimento. Pode ser desencadeada por vários estímulos dentre eles: DNA danificado, inanição, exposição à radiação ultravioleta, infecção viral, droga anticâncer. Disfunção nos mecanismos de apoptose pode resultar em doenças degenerativas, imunodeficiência, câncer, doenças auto-imunes e infecções virais. Células apoptóticas podem ser identificadas pelas seguintes mudanças morfológicas: redução do volume celular, condensação da cromatina nuclear, vacuolização citoplasmática, fragmentação do DNA e lise celular. A partir de então a célula é fragmentada em estruturas compactas membranosas para posteriormente serem fagocitadas por macrófagos e removidas do tecido sem gerar resposta inflamatória (Park *et al.*, 2005; Grivicich *et al.*, 2007).

Já a necrose ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas ocorrendo danos na membrana plasmática e conseqüentemente levando a morte celular (Grivicich *et al.*, 2007).

Nos testes de viabilidade celular verificamos que o fármaco dietilpropiona interfere nos mecanismos das células CHO, relacionados ao desencadeamento da morte celular programada. Confirmando o que afirmamos anteriormente em relação aos danos no DNA as células que receberam o fármaco na concentração de 20 µg/mL apresenta índice de apoptose menor do que receberam 10 e 40 µg/mL. sugerimos a mesma explicação dada anteriormente, ou seja na concentração de 10 µg/mL a droga interioriza na célula e interfere nos mecanismos de apoptose, na de 20 µg/mL atinge o equilíbrio permitido que a célula torne viável e na de 40 há saturação tornando a disparar os mecanismos de apoptose. Quanto à necrose não verificamos diferenças significativas

A falta de evidências de efeitos teratogênicos e mutagênicos para o fármaco dietilpropiona deve ser vista como falta de estudos *in vivo* e não como se a droga fosse inofensiva, pois sendo uma droga com ação semelhante a anfetamina é de se esperar que tenha comportamento tóxico semelhante e para anfetamina há evidências de efeitos teratogênicos e mutagênicos. De modo que recomendamos a continuidade dos estudos toxicológicos e sugerimos a introdução de testes *in vivo* para certificar os efeitos indiretos (Jha, 2008; Dietilpropion, 2010).

5.4 Sibutramina e Femproporex em Linfócitos de Indivíduos Obesos

Os linfócitos do sangue periférico são importantes indicadores presentes no compartimento interno do corpo humano. Apesar de serem produzidos no sistema hematopoiético, eles são posteriormente liberados e circulam por todos os órgãos do corpo. Esta particularidade os torna importantes ferramentas para avaliação de riscos genotóxicos causados por substâncias ministradas aos seres humanos, ou mesmo aquelas que são assimiladas devido à exposição ambiental.

Partindo da premissa que em indivíduos obesos o ambiente interno é rico em fatores com potencial para provocar instabilidade celular este estudo procurou certificar se os linfócitos obtidos destes indivíduos quando expostos aos fármacos anorexígenos femproporex ou sibutramina apresentam danos genotóxicos.

Verificamos por intermédio do Ensaio Cometa que tanto o fármaco sibutramina, quanto o fármaco femproporex nas concentrações avaliadas de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ provocam aumento nos escores de danos em linfócitos de indivíduos obesos expostos a diferentes concentrações destes fármacos por um período de 24 horas em condições de cultura. Este aumento é constatado confrontando-se os valores médios dos escores de danos nos DNA dos linfócitos tratados com os fármacos com o escore médio do tratamento controle negativo.

Podemos verificar também que não há resposta dose-efeito entre as diferentes concentrações de sibutramina; e da mesma forma entre as concentrações de femproporex. Para afirmar se os resultados de um teste genotóxico *in vitro* é positivo ou negativo algumas considerações tornam-se necessárias. Uma consideração essencial é que as substâncias testes apresentem escore de danos superior ao verificado no controle negativo; esta prerrogativa nosso estudo atende. Também recomendam a verificação da relação dose-resposta, fato não evidenciado em nossa avaliação. Além disso deve-se levar em consideração as propriedades físico-químicas das substâncias testes bem como a relevância dos resultados (OECD-Guideline 476, 1997). Em observância aos nossos dados podemos afirmar que a sibutramina e a femproporex causam danos no DNA de linfócitos de indivíduos obesos. Este achado *in vitro* soma-se ao estudo que fizemos *in vivo* onde também verificamos resultado positivo para ambos os fármacos. Como em nosso estudo *in vitro* não utilizamos sistema de ativação metabólica podemos afirmar que os danos detectados sejam devidos à ação direta dos fármacos. Para certificar este fato recomendamos a avaliação dos metabólitos originados destes fármacos. Também achamos providente verificar o

comportamento destes fármacos expostos a tratamento por 2 e 6 horas, pois nosso tratamento foi de 24 horas consecutivas e este longo período de exposição, talvez possa influenciar os resultados.

O Teste do Micronúcleo detecta danos não corrigidos que interferem na dinâmica da divisão celular ou no material genético. Em nosso estudo verificamos que o femproporex nas doses e condições avaliadas não aumenta a frequência de linfócitos micronucleados em comparação com o controle negativo. A sibutramina na dose de 20 µg/mL causou discreto aumento na frequência de linfócitos micronucleados quando comparado com o controle negativo. Visto que ambos os fármacos provocam aumento nos escores de danos no DNA de linfócitos, e apenas a sibutramina nesta concentração levou a formação de micronúcleo podemos sugerir que para o femproporex e as duas outras doses de sibutramina, os mecanismos de reparo e homeostase celular podem reverter os danos, enquanto na dose mais alta de sibutramina (20 µg/mL) há saturação destes mecanismos o que permite a fixação do dano na forma de micronúcleo.

O índice de divisão nuclear (IDN) é uma importante ferramenta para avaliar possíveis interferências das substâncias testes nos mecanismo de citocinese e cariocinese (Fenech, 2000). Em nosso estudo verificamos que tanto o fármaco sibutramina quanto o fármaco femproporex não apresentam diferenças nos IDNs de linfócitos quando comparado com o controle negativo, isto evidencia que os fármacos não estão impedindo a divisão celular nem estimulando-a. Fato intrigante é que nosso controle positivo também apresentou IDN similar ao controle negativo fenômeno similar também foi observado no estudo de Dhawan *et al.*, 2003. Podemos atribuir este comportamento a baixa dose utilizada (0,02 µg/mL) ou ao longo tempo de exposição.

Podemos concluir baseados em nosso estudo que os fármacos femproporex e sibutramina apresentam atividades genotóxicas *in vitro*, apesar de ser discreta em termos de magnitude. Estudos posteriores de farmacocinética e toxicogenética poderão melhor elucidar os mecanismos de ação tóxica destes fármacos.

5.5 C. *ecalyculata* e E. *grandiflorus* em Linfócitos de Indivíduos Obesos

Os extratos “brutos” de plantas são constituídos por uma mistura de várias substâncias químicas presentes em maior ou menor número e quantidade dependendo da espécie vegetal ou

até mesmo das condições do ambiente de origem. Tanto no extrato de *C. ecalyculata* quanto no de *E. grandiflorus* já foram identificadas substâncias com potencial proteção do material genético celular como, por exemplo, os flavonóides.

Em nosso trabalho verificamos que o extrato de *C. ecalyculata* na concentração de 50 µg/mL e o extrato de *E. grandiflorus* nas concentrações de 50 e 80 µg/mL aumentam os escores de danos no DNA de linfócitos quando comparados com o controle negativo. A possível explicação para a ação do extrato de *C. ecalyculata* apenas na concentração de 50 µg/mL e que na composição do extrato possa haver alguma substância genotóxica que isolada ou em associação encontra nesta concentração condições favoráveis para causar dano no DNA. Em dose inferior ou superior este equilíbrio é quebrado e a substância perde ou diminui a ação genotóxica.

No caso do *E. grandiflorus* verificamos que nas duas maiores concentrações o escore de danos é superior ao controle negativo. A explicação pode ser a mesma dada anteriormente para *C. ecalyculata* com a diferença que para o *E. grandiflorus* o intervalo de ação genotóxica da substância é mais amplo. Possivelmente se aumentar mais a dose o efeito ficará prejudicado, pois na concentração de 80 µg/mL já se percebe uma discreta redução no escore de danos em comparação com a concentração de 50 µg/mL.

Com relação a possíveis efeitos clastogênico/aneugênico os extratos dos fitoterápicos não apresentaram atividade e também não interferiram na citocinese e cariocinese dos linfócitos humanos.

Desta forma interpretamos a ação genotóxica dos extratos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* como fraco positivo, pois só detectamos efeitos pelo Ensaio Cometa, e este método, além de ser muito sensível, detecta danos possíveis de serem reparados. Associando estas informações ao estudo que fizemos *in vivo* podemos deduzir que os extratos brutos avaliados devem apresentar pouco risco genotóxico para humanos. Apesar disso recomendamos o estudo das frações constituintes de ambos os extratos para melhor elucidar suas ações.

Quanto ao estudo com material obtido de indivíduos obesos sugerimos ampliar a amostra, e também sugerimos estudos que explorem aspectos moleculares relacionados à mitocôndria.

6. CONCLUSÕES

Nas condições e metodologia deste estudo tanto a sibutramina quanto o femproporex aumentam a frequência de danos genéticos em células hematopoiéticas de camundongos Swiss;

Os fármacos sibutramina e femproporex não apresentam atividade citotóxica para PCE medulares de camundongo Swiss, certificado pela razão PCE/NCE;

Os extratos hidroalcólicos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* nas condições de nosso estudo não provocam danos clastogênicos/aneugênicos em PCEs da medula óssea de camundongos Swiss;

Os extratos hidroalcólicos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* nas condições de nosso estudo não apresentam atividade citotóxica para PCEs medulares de camundongo Swiss;

Os extratos hidroalcólicos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* nas condições de nosso estudo provocam fraca atividade clastogênica/aneugênica em PCEs eritrócitos do sangue periférico de camundongos Swiss;

O fármaco dietilpropiona avaliado nas condições de nosso trabalho apresenta fraca atividade genotóxica, mas interfere na viabilidade celular aumentando o índice de apoptose.

Nas condições e metodologia deste estudo tanto a sibutramina quanto o femproporex aumentam a frequência de danos genéticos em linfócitos de indivíduos obesos;

Os extratos de *C. ecalyculata* e *E. grandiflorus* induz fraca atividade genotóxica em linfócitos de indivíduos obesos , nas condições de nosso estudo;

O equipamento de eletroforese que desenvolvemos apresenta sensibilidade para detecção de danos genotóxicos, similar ao convencional nas condições de nosso estudo (Anexo C).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLFATHI Z, COUTURE J, VALLEE F, LEBEL M, TANGUAY M, MASSON E (2004). A pilot study to evaluate the pharmacokinetics of sibutramine in healthy subjects under fasting and fed conditions. **Journal of Pharmacological Sciences**. 7(3):345 - 349.

ADLER ID (1984). Cytogenetic tests in mammals. In: VENITT S, PARRY JM. Mutagenicity testing. **Oxford: IRL Press**. 275 - 306.

AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene . IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. v.82. World Health Organization - International Agency for Research on Cancer. **IARC Press**, Lyon - France

AGUILAR-SANTAMARÍA L, RAMÍREZ G, HERRERA-ARELLANO A, ZAMILPA A, JIMÉNEZ JE, ALONSO-CORTÉS D ,CORTÉS-GUTIÉRREZ EI, LEDESMA N, TORTORIELLO J (2007). Toxicological and cytotoxic evaluation of standardized extracts of *Galphimia glauca*. **Journal of Ethnopharmacology**. 109:35 - 40.

AHMADI A, HOSSEINIMEHR SJ, NAGHSHVAR F, HAJIR, E, GHAREMANI, M (2008). Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. **Archives of Pharmacal Research**. 31(6):794 - 797.

AKISUE MK, OLIVEIRA F, MORAES MS, AKISUE G, MANCINI B (1983). Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura de *Cordia verbenacea* A. DC.-Boraginaceae. **Revista de Ciências Farmacêuticas**. 5:69 - 82.

ALEISA AM, AL-REJAIE SS, BAKHEET SA, AL-BEKARI AM, AL-SHABANAH OA, AL-MAJED, ABDULHAKHEEM, AL-YAHYA, ABDULAZIZ A, QURESHI S (2007). Effect of metformin on clastogenic and biochemical changes induced by adriamycin in Swiss albino mice. **Mutation Research**. 634(1-2):93 - 100.

ALMEIDA AE, RIBEIRO ML, POLESE L (2000). Determination of anfepramone hydrochloride, fenproporex, and diazepam in so-called "natural" capsules used in the treatment of obesity. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. 23(7):1109 - 1118.

ANTUNES LMG, TAKAHASHI CS (1999). Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**. 19(1): 53 - 59.

- ARISAWA M, FUJITA A, HAYASHI T, HAYASHI K, OCHIAI H, MORITA N (1994). Cell growth inhibition of KB cells by plant extracts. **Natural Medicines**. 48:339 - 348.
- ATKINSON TJ (2008). Central and peripheral neuroendocrine peptides and signalling in appetite regulation: considerations for obesity pharmacotherapy. **Obesity Reviews**. 9:108 – 120.
- BARROSO ICE, OLIVEIRA F, BRANCO LHZ, KATO ETM, DIAS TG (2002). O gênero *Cordia* L.: botânica, química e farmacologia. **Revista Lecta: Rev. Farm. Biol. Bragança Paulista**. 20:15 - 34
- BASKIN ML, ARD J, FRANKLIN F, ALLISON DB (2005). Prevalence of obesity in the United States. **Obesity Reviews**. 6:5 - 7.
- BEHAR R (2002). Anorexígenos: indicaciones e interacciones. **Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria**. 40(2): 21 - 36.
- BEIGUELMAN B (1994). Curso prático de bioestatística. 3^a. ed. rev. Ribeirão Preto, **Revista Brasileira de Genética**. 244p.
- BERTRAM JS (2001).The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**. 21:167 - 223.
- BIANCHINI F, KAAKS R, VAINIO H (2002).Weight control and physical activity in cancer prevention. **Obesity Reviews**. 3:5 - 8.
- BRAITHWAITE AW, ROYDS JA, JACKSON P (2005). The p53 story: layers of complexity. **Carcinogenesis**. 26(7):1161 - 1169.
- BRAND MD, AFFOURTIT C, ESTEVES TC, GREEN K, LAMBERT AJ, MIWA S, PAKAY JL, PARKER N (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. **Free Radical Biology & Medicine**. 37(6):755 - 767.
- BUENO MAS, AGOSTINI JMS (2001). Estabelecimento de um controle histórico da frequência de eritrócitos micronucleados em camundongos da linhagem Swiss, do Biotério Central da UFSC – **Relatório Final. Departamento de Biologia Celular , Embriologia e Genética – Universidade Federal de Santa Catarina – Santa Catarina; 23p.**
- BURCHAM PC (1999). Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. **Mutation Research**. 443(1-2):11 - 36.

CALLE EE (2007). Adiposity and cancer. From: Nutrition and Health: Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease. Edited by: FANTUZZI G. and MAZZONE T. **Humana Press Inc.** Totowa, NJ.385p.

CALLE EE, RODRIGUEZ C, WALKER-THURMOND K, THUN MJ (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England Journal of Medicine*. 348 (17):1625.-.1638.

CAPARROZ-ASSEF SM, GRESPAN R, BATISTA RCF, BERSANI-AMADO FA, BARONI S, DANTAS JA, CUMAN RKN, BERSANI-AMADO CA, (2005). Toxicity studies of *Cordia salicifolia* extract. **Acta Scientiarum Health Science**. 27(1):41.-.44.

CARDOSO GLC, PEREIRA NA, LAINETTI R, (2003). Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*, [Cham. e Schl] Mitch, Alismataceae). *Revista Brasileira de Farmácia*. 84(1):5.-.7.

CARDOZO S, DE BONA LR, BARBOZA LT, ANDREOLLA HF, BOECK R, VIEIRA V, FRANTZ MA, MORISSO FDP, COITINHO AS, TAVARES RG (2008). Atividade hipolipidêmica do extrato de *Cordia salicifolia* em camundongos submetidos a dieta hiperlipidêmica. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre. 52 (3):182 - 186.

CHUANG, C-H, HU, M-L (2004). Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay. **Mutation Research**. 564:75 - 82.

CODY JT, VALTIER S, STILLMAN S (1999). Amphetamine and fenproporex levels following multidose administration of fenproporex. **J. Anal. Toxicol**. (23):187 - 194.

COHN DE, PAVELKA JC, FRANKEL WL, MORRISON CD, HAMPEL H, COPELAND LJ, FOWLER, JM (2008). Correlation between patient weight and defects in DNA mismatch repair: is this the link between an increased risk of previous cancer in thinner women with endometrial cancer?. **Int J Gynecol Cancer**. 18:136 - 140.

COLE RJ, TAYLOR N, COLE J, ARLETT, CF (1981). Short-term tests for transplacentally active carcinogens. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. **Mutat. Res.** 80:141 - 157.

COLLINS AR, OSCOZ AA, BRUNBORG G, GAIVÃO I, GIOVANNELLI L, KRUSZEWSKI M, SMITH CC, STETINA R (2008). The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**. 23(3): 143-151.

- CORREIA MP (1984). Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**. 1:514-516. 385p.
- COSTA M, TANAKA CMA, IMAMURA PM, MARSAIOLI AJ (1999). Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry** 50:117 - 122.
- COSTA LG, STEARDO L, CUOMO V (2004). Structural effects and neurofunctional sequelae of developmental exposure to psychotherapeutic drugs: experimental and clinical aspects. **Pharmacological Reviews**. 56:103 - 147.
- CRAGG G (1999). Medicinal plants, traditional medicine and drug discovery. Natural Products Branch Developmental Therapeutics Program Division of Cancer Treatment and Diagnosis. In: <http://dtp.nci.nih.gov/>; <http://dtp.nci.nih.gov/branches/npb/index.ht>. Acesso em dezembro de 2009.
- CROW GE (2003). Alismataceae: In: Manual de Plantas de Costa Rica, Hammel BE, Grayum MH, Herrera C and Zamora N (Eds), Monographs in Systematic Botany 92, St Louis: Missouri Botanic Garden, p. 35– 42.
- CRUZ GL (1995). Dicionário das plantas úteis do Brasil, 5ª ed. **Bertrand**, Rio de Janeiro, 599p.
- DE SANTIS M, STRAFACE G, CAVALIERE AF, CARDUCCI B, CARUSO A (2006). Early first-trimester sibutramine exposure: pregnancy outcome and neonatal follow-up. **Drug Safety**. 29(3):255 - 259.
- DE SOUZA G, HAAS A, VON POSER G, SCHAPOVAL E, ELISABETSKY, E (2004). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 90:135 - 143.
- DHAWAN A, KAYANI MA, PARRY JM, PARRY E, ANDERSON D (2003). Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human. *Mutagenesis*. 18(6): 487 – 490.
- DIAS TG (2004). Estudo farmacognóstico da porangaba (*Cordia ecalyculata* Vell. – Boraginaceae) e identificação de adulterações. Dissertação de mestrado – **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo** – São Paulo, Brasil. 147p.
- DIEHL AM, HOEK JB (1999). Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control "The benefits of losing control". **J Bioenerg Biomembr**. 31:493 - 506.

DIETHYLPROPION. Obtido in: <http://www.drugs.com/pro/diethylpropion.html>. Acesso em janeiro de 2010.

DUARTE MGR, SOARES IAA, BRANDÃO M, JÁCOME RLRP, FERREIRA MD, SILVA CRF, OLIVEIRA AB, (2002). Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana in vitro de plantas invasoras. **Revista Lecta**, Bragança Paulista. 20(2):177 - 182.

DUSINSKA M, COLLINS AR (2008).The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**. 23(3):191 - 205.

ERNST E (2004). Risks of herbal medicinal products. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**. 13:767 - 771.

EASTMOND DA, TUCKER JD (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environ Mol Mutagen**. 13:34-43.

FALKENBERG M (2001). Quinonas. IN: SIMÕES CMO. *et al.* (Orgs.). Farmacognosia: da Planta ao medicamento. 3ª ed. Porto Alegre – UFRGS. Ed. da UFSC., p.555-580.

FEARON ER, VOGELSTEIN B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**. 61:759 - 767.

FENECH M AND MORLEY AA (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat Res**. 147: 29-36.

FENECH M (2000). The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. 455(1-2):81 - 95.

FERGUSON LR (1999). Natural and man-made mutagens and carcinogens in the human diet. **Mutation Research**. 443:1 - 10.

FISHER MH, AMEND AM, BACH TJ, BARKER JM, BRADY EJ, CANDELORE MR, CARROLL D, CASCIERI MA, LEE CHIU SH, DENG L, FORREST MJ, HEGARTY-FRISCINO B, GUAN XM, HOM GJ, HUTCHINS JE, KELLY LJ, MATHVINK RJ, METZGER JM, MILLER RR, OK HO, PARMEE, ER, SAPERSTEIN R, STRADER CD STEARNS RA, THOMPSON GM, TOTA L, VICARIO PP, WEBER AE, WOODS JW, WYVRATT MJ, ZAFIAN PT, MACINTYRE DE (1998). A selective human β_3 adrenergic receptor agonist increases metabolic rate in Rhesus monkeys. **Journal of Clinical Investigation**. 101(11):2387 - 2393.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Warns consumers about Brazilian diet pills found to contain active drug ingredients. FDA Expands Weight-Loss Products Safety Alert. **MedWatch**, Food and Drug Administration. From: www.fda.gov/medwatch/report.htm, in 2006.

FRACASSO ME, FRANCESCHETTI P, DORIA D, TALAMINI G, BONETTI F (2004). DNA breaks as measured by the alkaline comet assay in exfoliated cells as compared to voided urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: a study of 105 subjects. **Mutat. Res.** 564:57–64.

FRIEDMAN JM (2000). Obesity in the new millennium. **Nature**. 404:632 - 634.

GALVAN-ARZATE S, SANTAMARÍA A (2002). Neurotoxicity of diethylpropion neurochemical and behavioral findings in rats. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 965:214 - 224.

GARCIA-MIJARES M, BERNARDES AMT, SILVA MTA (2009). Diethylpropion produces psychostimulant and reward effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 91:621 - 628.

GEWIRTZ DA (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**.57:727 - 741.

GOLLAPUDI BB, MCFADDEN LG (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**. 347(2):97 - 99.

GORRINGE KL, CHIN SF, PHAROAH P, STAINES JM, OLIVEIRA C, EDWARDS PAW, CALDAS C (2005). Evidence that both genetic instability and selection contribute to the accumulation of chromosome alterations in cancer. **Carcinogenesis**. 26(5):923 - 930.

GRIVICICH I, REGNER A, ROCHA, AB (2007). Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 53(3):335 - 343.

GURIB-FAKIM A (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. 27:1 - 93.

GUZMÁN A, FERNÁNDEZ DE HENESTROSA AR., MARÍN A-P, AHN HO, BORROTO JIG, CARASA I, PRITCHARD L (2007). Evaluation of the genotoxic potential of the natural neurotoxin tetrodotoxin (TTX) in a battery of in vitro and in vivo genotoxicity assays. **Mutation Research**. 634(1-2): 14 - 24.

HAINER V, KABRNOVA K, ALDHOON B, KUNESOVA M, WAGENKNECHT M (2006). Serotonin and norepinephrine reuptake inhibition and eating behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1083:252 - 269.

HAMILTON A (2005). Medicinal plants and conservation: issues and approaches Surrey, U.K. **International Plants Conservation Unit**, WWF-UK.

HAN YU, ROTHMAN RB, DERSCH CM, PARTILLA JS, RICE KC (2000). Uptake and release effects of diethylpropion and its metabolites with biogenic amine transporters. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 8:2689 - 2692.

HARTMANN A, SPEIT G (1997). The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**. 90(2-3):183 - 188.

HARTMANN A, KISKINIS E, FJAELLMAN A, SUTER, W (2001). Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. **Mutat. Res**. 497: 199 - 212.

HAYASHI K, HAYASHI T, MORITA N, NIWAYAMA S (1990). Antiviral activity of an extract of *Cordia salicifolia* on herpes simplex virus type 1. **Planta Med**. 56:439 - 443.

HAYNES RR, NIELSEN, LBH (1994). Flora Neotropica - Monograph 64 - The Alismataceae, New York: **New York Botanical Garden**. 105 p.

HOFFMANN H, SPEIT G (2005). Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research**. 581:105–114.

HUGGET AC, SCHILTER B, ROBERFROID M, ANTIGNAC E, KOEMAN JH (1996). Comparative methods of toxicity testing. **Food. Chem. Toxic**. 34: 183 - 92.

ICH (2008). HARMONIZED TRIPARTITE GUIDELINE S2(R1). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. **The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Genève, Switzerland. 1 – 26p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (2002). Handbooks of Cancer Prevention: Weight control and physical activity. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon. 316p.

JHA AN (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**. 23(3):207 - 221.

JUNTA INTERNACIONAL DE FISCALIZAÇÃO DE ENTORPECENTES – JIFE (2005). Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC-Brasil e Cone Sul. Brasília – DF, Brasil,. Disponível em: www.unodc.org/brazil/pt/pressrelease_20080403.html). Acesso em janeiro de 2010.

KARAHALIL B, YAGA S, BAHADIR G, DURAK PE, SARDAS S (2005). Diazepam and propofol used as anethetics duringoen-heart sugeri do not cause chromosomal aberrations in peripheral blood linphocytes. **Mutat Res**. 581:181 - 186.

KELLY F, JONES SP, LEE IK (1985). Sibutramine weight loss in depressed patients. **Int. J. Obes**. 19:145.

KIORTSIS D, TSOULI S, FILIPPATOS T, KONITSIOTIS S, ELISAF M (2008). Effects of sibutramine and orlistat on mood in obese and overweight subjects: a randomised study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**.18(3):207 - 210.

KLOK MD, JAKOBSDOTTIR S, DRENT ML (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. **Obesity Reviews**. 8:21 - 34.

KOBAYASHI J, SEKIGUCHI M, SHIGEMORI H AND OHSAKI A (2000a). Chapecoderins A-C, new labdane-derived diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **J Nat Prod**. 63:375 - 377.

KOBAYASHI J, SEKIGUCHI M, SHIGEMORI H, OHSAKI A (2000b). Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Tetrahedron Lett**. 41: 2939 - 2943.

KONAN NA, BACCHI EM, LINCOPAN N, VARELA SD, VARANDA EA (2007). Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**.110:30 - 38.

KOPELMAN P (2007). Health risks associated with overweight and obesity. **Obesity Reviews**. 8 (1):13 - 17.

KOWALLOWSKI AJ (2000). Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 33(2):241 - 250.

KRAEMER T, PFLUGMANN T, BOSSMANN M, KNELLER NM, PETERS FT, PAUL LD, SPRINGER D, STAACK RF, MAURER HH (2004). Fenproporex N-dealkylation to amphetamine-enantioselective in vitro studies in human liver microsomes as well as enantioselective in vivo studies in Wistar and dark Agouti rats. **Biochemical Pharmacology**. 68:947 - 957.

KRISHNA G, HAYASHI M (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**. 455(1-2):155 - 166.

LESSA MA, ARAÚJO CV, KAPLAN MA, PIMENTAB D, FIGUEIREDO MR, TIBIRIÇÁ E (2008). Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. 22:161 - 168.

LOEB LA, CHRISTIANS FC (1996). Multiple mutations in human cancers. **Mutation Research**. 350:279 - 286.

LOPES L, ALBANO F, LARANJA G, ALVES L, SILVA L, SOUZA G, ARAÚJO I, NOGUEIRA NETO J, FELZENSZWALB I, KOVARY K, (2000). Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology Letters**. 116:189 - 198.

LORENZI H (1992). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: **Editora Plantarum**. 69 - 115 p.

LOVELL DP, OMORI T (2008). Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**. 23 (3):171 - 182.

LOWELL BB, SPIEGELMAN BM (2000). Towards a molecular understanding of adaptative thermogenesis. **Nature**. 404:652 - 660.

LUQUE CA, REY JA (2002). The discovery and status of sibutramine as an anti-obesity drug. **European Journal of Pharmacology**. 440(2-3):119 - 128.

MANNS D, HARTMANN R (1993). Echinodol: a new cembrene derivative from *Echinodorus grandiflorus*. **Planta Medica**. 59:465 - 466.

MAO W, IWAI C, KENG PC, VULAPALLI R, LIANG C-S (2006). Norepinephrine-induced oxidative stress causes PC-12 cell apoptosis by both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial intrinsic pathway: inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase survival pathway. **Am J Physiol Cell Physiol**. 290:C1373 - C1384.

- MARIZ SR (2004). Aspectos toxicológicos do femproporex. **Revista Brasileira de Toxicologia**. 17(1):39 - 47.
- Martindale: the extra pharmacopeia (1996). Edited by Reynolds, JEF, **Royal Pharmaceutical Society**, London. 334 p.
- MATTER BE, TSUCHIMOTO, T (1980). Mutagenicity test systems for detection of chromosome aberrations in vivo. **Arch. Toxicol**. 46:89 - 98.
- MAVOURNIN KH, BLAKEY DH, CIMINO MC, SALAMONE MF, HEDDLE JA (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**. 239(1):29 - 80.
- MCCOURT CK, MUTCH DG, GIBB RK, RADER JS, GOODFELLOW PJ, TRINKAUS K, POWELL MA (2007). Body mass index: relationship to clinical, pathologic and features of microsatellite instability in endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**. 104:535–539)
- MCKENNA DJ, MCKEOWN SR, MCKELVEY-MARTIN VJ (2008). Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**. 23(3):183 - 190.
- MELLO MLS (1997). Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Brazilian Journal Genetics**. 20(2):257 - 264.
- MENGHINI L, EPIFANO F, LEPORINI L, PAGIOTTI R, TIRILLINI B (2008). Phytochemical investigation on leaf extract of *Cordia salicifolia* Cham. **Journal of Medicinal Food**. 11, 193 - 194.
- MOORHEADS PS, NOWELL PC, MELLMAM WJ, BATTIPS DM, HUNGERFORD DA (1960). Chromosome preparations of leukocytes culture from human peripheral blood. **Exp Cell Res** 20:613 - 616.
- MOREIRA CQ, FARIA MJ, MOREIRA, EG (2005). Behavioral neurotoxicity in adolescent and adult mice exposed to fenproporex during pregnancy. **Human & Experimental Toxicology**. 24(8):403 - 8.
- MORS WB, RIZZINI CT, PEREIRA NA (2000). Boraginaceae. In: Medicinal plants of Brasil. Algonac: Reference Publications. **Medicinal plants of the world**. 6:87 - 90 p.

MUSSHOFF F (2000). Illegal or legitimate use? precursor compounds to amphetamine and methamphetamine. **Drug Metabolism Reviews**. 32(1):15 - 44.

NAGY TR, BLAYLOCK ML, GARVEY WT (2004). Role of UCP2 and UCP3 in nutrition and obesity. **Nutrition**; 20:139 - 144.

NAPPO SA (1996). Consumption of anorexigenic amphetamine-like drugs (diethylpropion, fenproporex and mazindol) and of d,l-fenfluramine in Brazil during the years of 1988 and 1989. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**. 5:19 - 25.

NEBERT DW, ROE AL (2001). Ethnic and genetic differences in metabolism genes and risk of toxicity and cancer. **The Science of the Total Environment**. 274:93 - 102.

NERY R (1976). Carcinogenic mechanisms: a critical review and a suggestion that oncogenesis may be adaptive ontogenesis. **Chem.-Biol. Interactions**. 12:145 - 169.

NORPPA H, FALCK GCM (2003). What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**. 18:221 - 233.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) (1997). OECD guidelines for the testing of chemicals: mammalian erythrocyte micronucleus test; Section 4, **Guideline 474**.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD, (1997). Guideline For The Testing Of Chemicals. In vitro mammalian cell gene mutation test. **Guideline 476**.

PARK HJ, KIM YJ, LEEM K, PARK SJ, SEO JC, KIM HK, CHUNG JH (2005). *Coptis japonica* root extract induces apoptosis through caspase3 activation in SNU-668 human gastric cancer cells. **Phytother. Res**. 19:189 - 192.

PATWARDHAN B, (2005). Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**. 100:50 - 52.

PHYSICIANS DESK REFERENCE (PDR) (2004). 58th. ed. **Thomson**. Montvale, NJ; 491 - 496.

PIMENTA DS, FIGUEIREDO MR, KAPLAN MAC (2006). Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli (Chapéu de couro) **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 78(4):623 - 628.

PRAKASH AS, PEREIRA, TN, REILLY PEB, SEAWRIGHT AA (1999). Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutat. Res./ Genet. Toxicol. Environ. Mutagen**. 443 (1):53 - 67.

PUSHPANGADAN P; NAIR KN (2005). Value addition and commercialization of biodiversity and associated traditional knowledge in the context of the intellectual property regime. **Journal of Intellectual Property Rights**. 10:441 - 453.

QUILES JL, HUERTAS JR, BATTINO M, MATAIX J, RAMIREZ-TORTOSA BW (2002). Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*, 180:79 - 95.

RAMZI F, ELIAS D, MONA S, ZREIK TG (2005). Sibutramine in pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. 122(2):243 - 244.

RAPISARDA A, RAGUSA S, DE PASQUALE A (1997). Hepatotoxic effect of the leaves of some *Cordia* species. **Acta Horticulturae Leuven**. 223:237 - 391.

RAVUSSIN E, BOUCHARD C (2000). Human genomics and obesity: finding appropriate drug targets. **European Journal of Pharmacology**. 410:131 - 145.

RIBEIRO LR, SALVADORI DMF, MARQUES EK- Organizadores – (2003). Nutagênese ambiental. Canoas, RS. **Editora da Universidade Luterana do Brasil**.355p.

RIETJENS IMCM, BOERSMA MG, VAN DER WOUDE H, JEURISSEN SMF, SCHUTTE ME, ALINK GM (2005). Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mutation Research**. 574(1-2);124.-138.

SAITO ML, OLIVEIRA F (1986). Morfodiagnose e identificação cromatográfica em camada delgada de chá de bugre – *Cordia ecalyculata* Vell. **Revista Brasileira de Farmácia**. 67:1 - 16.

SAITO ML (1984). Farmacognosia de *Cordia ecalyculata* Vell.(Boraginaceae).. Dissertação (Mestrado em Fârmaco e Medicamentos). **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** - Pós-Graduação em Fârmaco e Medicamentos - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 144 p.

SAITO ML, OLIVEIRA FD, ALVARENGA MA (1985). Allantoin and other chemical constituents of *Cordia eucalyculata*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**. 21(1):14 - 19.

SCHIPPMANN U, LEAMAN DJ, CUNNINGHAM AB (2002). Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues. Inter- Department Working Group on Biology Diversity for Food and Agriculture, Rome, Italy: **Food and Agriculture Organizations** (FAO).

SCHLEGEL R, MACGREGOR JT (1982). The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. **Mutation Research Letters**. 104(6):367 - 369.

SCHNABELE K, ROSER S, RECHKEMMER G, HAUNER H, SKURK T (2009). Effects of adipocyte-secreted factors on cell cycle progression in HT29 cells. **Eur J Nutr**. DOI 10.1007/s00394-009-0775-6.

SERVIDDIO G, BELLANTI F, ROMANO AD, TAMBORRA R, ROLLO T, ALTOMARE E, VENDEMIALE G (2007). Bioenergetics in aging: mitochondrial proton leak in aging rat liver, kidney and heart. **Redox Report**. 12(1-2):91 - 95.

SHAW-REAGAN S, NIHAL M, AHMAD N (2007). Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**. 22:659 - 66.

SHAY, JW, WRIGHT WE (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. **Carcinogenesis**. 26(5):867 - 874.

SILVEIRA MB, CARRARO R (2005). Tratamiento actual de la obesidad: perspectivas. **Actualidad en Farmacología y Terapéutica (AFT)**. 3(4):238 - 246.

SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp CellRes**. 175:184 - 191.

SIQUEIRA VLD, CORTEZ DAG, OLIVEIRA CE, NAKAMURA CV, BAZOTTE RB (2006). Pharmacological studies of *Cordia salicifolia* Cham in normal and diabetic rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 49 (2): 215-218.

SMITH LB (1970). Flora ilustrada Catarinense: Boragináceas. Itajaí: **Herbário Barbosa Rodrigues**. Pt.1, p.3:28-30.

SNYDER RD, GREEN JW (2001). A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**. 488(2):151 - 169.

SOUZA SC, CHRISTOFFOLETE MA, RIBEIRO MO, MIYOSHI H, STRISSEL KJ, STANCHEVA ZS, ROGERS NH H., D'EON TM, PERFIELD JW, IMACHI H, OBIN MS, BIANCO AC, GREENBERG AS (2007). Perilipin regulates the thermogenic actions of norepinephrine in brown adipose tissue. **Journal of Lipid Research**. 48:1273 - 1279.

STICH HF, CURTIS JR, PARIDA BB (1982). Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **International Journal of Cancer**. 30(5):553 - 559.

SUTER W, MARTUS HJ, ELHAJOUJI A (2006). Methylphenidate is not clastogenic in cultured human lymphocytes and in the mouse bone-marrow micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 607(2):153 - 159.

TANAKA CMA, SARRAGIOTTO MH, ZUKERMANSCHPECTOR J, MARSAIOLI AJ (1997). A cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**. 44:1547 - 1549.

TANAKA CMA (2000). Constituintes químicos de cinco espécie de *Echinodorus* e avaliação do beta pineno como substrato para obtenção de quirons mais elaborados. Tese de doutorado – **Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas** – Campinas, São Paulo, Brasil. Parte A, 130p.

TIBIRIÇÁ E, ALMEIDA A, CAILLEAUX S, PIMENTA D, KAPLAN MA, LESSA, MA, FIGUEIREDO MR (2007). Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Ethnopharmacology**. 111:50 - 55.

TICE RR, FUREDI-MACHACEK M, SATTERFIELD D, UDUMUDI A, VASQUEZ M, DUNNICK JK (1998). Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the p53 gene. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 31(2): 113 - 124.

TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU JC, SASAKI YF (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genotoxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 35(3):206 - 21.

TRAYHURN P (2007). Adipocyte biology. **Obesity Reviews**. 8(1):41 - 44.

TUBIANA M (2009). La prévention du cancer et la relation dose–effet : l’effet cancérigène des rayonnements ionisants. **Cancer/Radiothérapie**.13:238 - 258.

TURKER MS (2000). Somatic cell mutations: can they provide a link between aging and cancer? **Mechanisms of Ageing and Development**. 117:1 - 19.

UDROIU I (2006). Feasibility of conducting the micronucleus test in circulating erythrocytes from different mammalian species: an anatomical perspective. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 47:643 - 646.

UTESCHA D, FEIGEA K, DASENBROCKA J, BROSHARDA TH, HARWOODB M, DANIELEWSKA-NIKIELB B, LINESC TC (2008). Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. **Mutation Research**. 654:38.-44.

VIJAYALAXMI, KLIGRMAN AD, PRIHODA TJ, ULLRICH SE (2006). Micronucleus studies in the peripheral blood and bone marrow of mice treated with jet fuels, JP-8 and Jet-A. **Mutation Research**. 608(1):82 - 87.

VOGEL, F, MOTULSKY, AG (2000). Genética humana: problemas e abordagens. 3ª ed. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan S.A.** 684p.

WASSON GR, MCKELVEY-MARTIN VJ, DOWNES CS (2008). The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**. 23(3):153 - 62.

WITT KL, ZEIGER E, TICE RR, ANGÉLIQUE PJM, VAN BIRGELEN APJM (2000). The genetic toxicity of 3,3', 4,4'-tetrachloroazobenzene and 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene: discordance between acute mouse bone marrow and subchronic mouse peripheral blood micronucleus test results. **Mutation Research**. 472:147 - 154.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2002). Traditional Medicines Strategy 2002–2005, Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2006). Obesity and overweight. Media Centre, **Fact Sheet N° 311**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva, Switzerland.

ZHANG QH, WU CF, DUANA L, YANG JY (2008). Protective effects of total saponins from stem and leaf of *Panax ginseng* against cyclophosphamide-induced genotoxicity and apoptosis in mouse bone marrow cells and peripheral lymphocyte cells. **Food and Chemical Toxicology**. 46(1):293 - 302.

ZHANG R, KANG KA, PIAO MJ, OK KO D, WANG ZH, CHANG WY, HO JIN YOU HJ, LEE IK, KIM BJ, KANG SS, HYUN JW (2009). Preventive effect of 7,8-dihydroxyflavone against oxidative stress induced genotoxicity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. 32(2): 166 - 171.

Anexo A: Artigo Publicado

Journal of Ethnopharmacology 127 (2010) 445–450



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*

Cristiano José da Silva^{a,*}, Jairo Kenupp Bastos^c, Catarina Satie Takahashi^{a,b}

^a Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, São Paulo CP: 14049-900, Brazil

^b Department of Biology, Faculty of Philosophy Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2009
Received in revised form 8 October 2009
Accepted 8 October 2009
Available online 27 October 2009

Keywords:

Cytotoxic
Genotoxic
Cordia ecalyculata
Boraginaceae
Echinodorus grandiflorus
Alismataceae

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Cordia ecalyculata* Vell. and *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli are extensively used in Brazil as therapeutic preparations for indigenous groups and the general population. These plants have been used in the folk medicine as: tonic, diuretic, anti-inflammatory, appetite suppressants, for the treatment of snake bites, and weight loss.

Aim of the study: In this study, it was verified the possible cytotoxic and genotoxic effects of the crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*, as well as their effectiveness in treating obesity.

Materials and methods: The Micronucleus Test was used for the evaluation of possible clastogenic and aneugenic effects, and the Comet Assay was used for the evaluation of single-strand and double-strand DNA breaks. The cytotoxic effects of the crude extracts were verified by PCE/NCE ratio. Swiss mice (*Mus musculus*) were used as the experimental model.

Results: It was observed a significant ($P < 0.05$) increase, dose-independent, in the average frequency of micronucleated erythrocytes in peripheral blood in mice treated with either the *Cordia ecalyculata* or *Echinodorus grandiflorus* extracts, in comparison with the negative control. There were no significant differences ($P > 0.05$) in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes for both extract treatment. We observed that treatment with the *Cordia ecalyculata* extract at concentrations of 1000 and 2000 mg/kg bw resulted in a PCE/NCE ratio that was larger ($P < 0.05$) than the negative control. After 15 days of daily treatment, a dose of 2000 mg/kg bw of either phytotherapeutic did not reduce body mass gain or the amount of food consumed by Swiss mice when compared with the negative control ($P > 0.05$).

Conclusion: The results of this study allowed us to infer that the crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus* do not display cytotoxic or genotoxic activities. However, they do possess weak clastogenic activity (without significance) on peripheral blood cells. Contrary to commonly held beliefs it was also found in this study that the extracts are not effective for obesity treatments.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The consumption of plant medicines has received increased attention and their usage has grown in recent times. One of the justifications for this growth in consumption is that more people have a desire to return to a more natural way of living and

there is an increased belief that every natural product is healthy and safe. However, scientific studies on this subject have reported that there are many compounds within plants that can have toxic, genotoxic, and carcinogenic effects when used chronically (Ernst, 2004; Rietjens et al., 2005).

A classic example of the potential danger of plant compounds are the pyrrolizidine alkaloids and their N-oxide derivatives, which are found in thousands of vegetable species and can be genotoxic and carcinogenic, and thus pose significant health risks to humans and animals (Mei et al., 2007).

An example of a beneficial class of plant compounds are the polyphenols, which are present in several vegetable species and are well known antioxidant agents. For example, the natural polyphenols present in tea serve as excellent antioxidants (Sinha et al., 2007). Brazil is uniquely suited to foster the discovery of new

Abbreviations: DNA, deoxyribonucleic acid; PCEs, polychromatic erythrocytes; NCEs, normochromatic erythrocytes; MNPCes, micronucleated polychromatic erythrocytes; OECD, organization for economic cooperation and development; TCAB, tetrachloroazobenzene; TCAOB, tetrachloroazoxybenzene; SD, standard deviation; MNNCes, micronucleated normochromatic erythrocytes.

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3082; fax: +55 16 3633 0069.

E-mail addresses: cristiano profeta@hotmail.com, profeta@usp.br (C.J. da Silva), jkbastos@fcfp.usp.br (J.K. Bastos), estakaha@usp.br (C.S. Takahashi).

0378-8741/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jep.2009.10.015

compounds that can be used for the development of therapeutic agents. The country's tremendous plant biodiversity together with the strong focus on ethnopharmacological studies places Brazil in a prominent position in the world scenery. However, the country still lacks a complete inventory and scientific evaluation of these resources and needs the invigoration of the local pharmaceutical industry (Duarte et al., 2002; Kobayashi et al., 2000).

Obesity and emergent infectious diseases are currently top areas of concern in the field of public health. Obesity reduces the quality of life and increases public expenses, because it is closely related to other chronic illnesses such as diabetes and cancer (Calle et al., 2003; Kopelman, 2000).

Due to factors such as the high cost of medicine and the collateral effects of the allopathic anorexigens, popular knowledge of how to utilize natural medicines found in the plants has been transmitted through the generations. *Cordia salicifolia* Cham. (Boraginaceae) (sin. *Cordia ecalyculata* Vell.), also known by several common names such as "porangaba", "chá de bugre", or "café do mato", is a small tree that is 8–12 m in height with a trunk diameter of 30–40 cm. *Cordia ecalyculata* Vell. produces red fruit that resembles a coffee bean, which is roasted and brewed into tea as a coffee substitute. It is indigenous in Brazil, but can also be found in tropical forest areas of Argentina and Paraguay. *Cordia ecalyculata* Vell. is largely used in the ethnomedical traditions of the Brazilian people (Cruz, 1995 in Siqueira et al., 2006; Lopes et al., 2000; Menghini et al., 2008). *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli. (Alismataceae) (sin. *Alisma grandiflorum* Cham. & Schltld.), *Echinodorus floribundus* Seub., *Echinodorus muricatus* Griseb., also known by common names such as "chapéu-de-couro", "chá-mineiro", "erva-do-brejo", "congonha-do-brejo", and "aguapé", is an aquatic, perennial, herbaceous plant measuring 1.5–2 m in height that can be found throughout Brazil. It is used in folk medicine as a tonic, diuretic, anti-inflammatory, and as a treatment for snake bites (Cardoso et al., 2003; Cruz, 1995 in Siqueira et al., 2006). Extracts of this plant species are commercialized in Brazil as diuretics, appetite suppressants, and weight loss products.

The aim of this work was the evaluation of the crude hydroethanolic extracts of these two phytotherapeutics regarding the potential risks for genotoxicity and/or cytotoxicity in Swiss mouse cells. It was used as positive control the anthracycline antibiotic doxorubicin, commonly used to treat a wide variety of cancers. The primary mechanism of drug action is likely to be through interaction with topoisomerase II. The effects of doxorubicin involve the production of free radicals, increase in DNA strand breakage, chromosome aberrations and increases in the micronucleus formation *in vitro* as well as *in vivo* (Aleisa et al., 2007; Gewirtz, 1999; Resende et al., 2007). For that, two short duration tests were undertaken: the Comet Assay (DNA damage) and the Micronucleus Test (chromosomal damage), which are accepted and recommended for certification in the pharmaceutical industry. Therefore, this work brings a contribution to the knowledge of Brazilian plant resources and offers information regarding its safe use.

2. Materials and methods

The evaluation of the possible genotoxic and cytotoxic effects of pharmaceuticals is frequently accomplished using tests of short duration, which are required by the regulatory agencies that authorize the use of chemicals worldwide. In this study, the Micronucleus Test was used for the evaluation of possible clastogenic and aneugenic effects, and the Comet Assay was used for the evaluation of single-strand and double-strand DNA breaks. The cytotoxic effects of the crude extracts were verified by comparing the relation between PCEs (polychromatic erythrocytes) and NCEs (normochromatic erythrocytes) in the bone marrow of mice (PCE/NCE ratio). Swiss mice (*Mus musculus*) were used as the experimental model

for the *in vivo* study, because genotoxicity and/or carcinogenicity in rodents represent an increased risk of carcinogenicity in humans. This standard has been adopted by the regulatory agencies in several countries. All experiments involving animals were carried out in full compliance with the best laboratory practice guidelines.

2.1. Plant material and chemicals

The botanical medicines were purchased from specialized commercial establishments that are officially authorized for the commercialization of these products:

Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schltld.) Micheli
Used part: Leaves
Country of origin: Brazil
Dried in: Oven
Family: Alismataceae
Lot no: CHPCP01/0107
Phytochemical analysis: Positive test for flavonoids, steroids, saponins, and polyphenols (Manns and Hartmann, 1993; Duarte et al., 2002)
The plant (dried powdered leaves) was purchased in Santos Flora Comércio de Ervas Ltda. São Paulo; SP, Brazil.

Cordia ecalyculata Vell. (sin. *Cordia Salicifolia* Cham.)
Used part: Leaves
Country of origin: Brazil
Dried in: Oven
Family: Boraginaceae
Lot no: 164-F/05
Phytochemical analysis: positive test for saponins, anthocyanins, gums and mucilage, mineral salts, flavonoids, amide, tannins, amine groups, fixed acids, and steroids.
The plant (dried powdered leaves) was purchased in, Hubert Comércio de Produtos Alimentícios Ltda. São José dos Pinhais; PR, Brazil.

Doxolem®: Chlorohydrate of doxorubicin, CAS Registry 23214-92-8; Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, Pindamonhangaba; SP, Brazil, was used as positive control

2.2. Extract preparation

One kilogram of dried and powdered leaves from each plant (*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli. and *Cordia ecalyculata* Vell.) was submitted to exhaustive extraction by maceration at room temperature in a steel percolator using ethanol–water (7:3) solution. The obtained extracts were filtered and concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator at 35–40 °C, followed by lyophilization to furnish the crude hydroalcoholic extracts (15% and 17% (w/w) for *Echinodorus grandiflorus* and *Cordia ecalyculata*, respectively). The extracts were stored in amber flasks protected against the light.

2.3. Mouse treatment protocol

The Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil – approved the protocols used in this study (Protocol n° 032/2006). Male Swiss mice (4–6 weeks old) were obtained from the Animal House of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, and housed individually in polypropylene cages covered with metallic grids in a room maintained at 22 ± 2 °C, 55 ± 10% humidity, and with a 12 h light-dark cycle. They were fed with commercially available Nuvilab CR1 chow (Colombo; PR, Brazil) and water *ad libitum* for a 5-day acclimation period.

Mice were randomly divided into eight groups with six male animals each (for each treatment it was performed three independent experiments with two repetitions). Each of them received either 10 mL/kg body weight (bw) of distilled water, 5 mg/kg bw of doxorubicin, or *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus* in the stated doses by gavage. They were euthanized by cervi-

cal dislocation 24 h after administration. Based on a preliminary study, the following doses were selected for use in this study: 500, 1000, and 2000 mg/kg bw of *Cordia ecalyculata* (Porangaba) and *Echinodorus grandiflorus* (Chapéu-de-couro) and 5 mg/kg bw of doxorubicin (Krishna and Hayashi, 2000; Guidelines for the Testing of Chemicals (OECD), 1997).

2.4. Mouse bone marrow micronucleus test

Immediately after euthanasia, the femurs were dissected and the bone marrow was extracted and suspended in tubes containing 2 mL of pre-warmed (37 °C) fetal calf serum (Biological Industries). Tubes were centrifuged at 180 × g for 5 min and the supernatants were discarded. The pellets were resuspended in two to three drops of fetal calf serum and spread on slides (two slides per animal). Smears were fixed with methanol and stained with 5% May Grünwald–Giemsa. Slides were coded and examined by light microscopy. Two slides per animal were prepared and 1000 polychromatic erythrocytes (PCEs) per slide were analyzed for the presence of micronuclei. The relative proportion of PCEs and normochromatic erythrocytes (NCEs) was determined by counting a total of 200 erythrocytes per slide. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) among 2000 PCEs was determined. The data were analyzed using the Student's *t*-test and ANOVA. Results were considered positive when there was a statistically significant increase ($P < 0.05$) in the frequency of MNPCEs for at least one dose, which exceeded the negative control range (Krishna and Hayashi, 2000; Guidelines for the Testing of Chemicals (OECD), 1997; Guzmán et al., 2007).

2.5. Mouse peripheral blood micronucleus test

Peripheral blood was spread on microscope slides and air-dried. The next day, slides were stained by the Feulgen reaction with modification. To summarize the fixation procedure, the slides were kept in 5N HCl for 20 min at room temperature. After hydrolysis, slides were washed three times in distilled water and transferred into Schiff's reagent for 60 min. The preparations were washed and stained with Fast Green (Sigma Chemical Company) for 25 min for cytogenetic analysis (Stich et al., 1982; Mello, 1997).

2.6. Comet Assay

The single-cell electrophoresis assay, or Comet Assay, was performed under alkaline conditions. Briefly, 15 µL of each blood sample were mixed with 160 µL of 0.5% low-melting-point agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37 °C and layered onto conventional microscope slides precoated with 1.5% normal-melting-point agarose (Invitrogen). The slides were incubated overnight in freshly prepared cold lysing solution (1% Triton X-100, 2.5 mM NaCl, 0.1 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris with 10% dimethylsulfoxide, pH 10.0) and then into a horizontal electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH > 13) at 4 °C for 20 min. Using the same buffer, electrophoresis was performed at 25 V and 300 mA for 20 min. After electrophoresis, the slides were rinsed three times in neutralizing buffer (0.4 M Tris–HCl, pH 7.5), fixed for 5 min in absolute alcohol, air-dried, and stored at room temperature. The slide (DNA) was stained with silver and examined with a 40× objective using a light microscope. Coded slides were scored in a blind test and 50 blood cells were randomly analyzed for each animal (25 cells per slide from two slides per animal). Cells were visually scored and categorized into five classes according to tail size, from undamaged (0) to maximally damaged (4), and a value (damage index) was assigned to each comet according to its class. The damage index, thus, ranged from 0 (completely undamaged: 50 cells × 0) to 200 (with maximum damage: 50 cells × 4). Comets with a "cloudy" appearance

or a very small head and a tail like a balloon (necrotic/apoptotic cells) were excluded from the evaluation under the assumption that they represented dead cells (Hartmann and Speit, 1997; Tice et al., 2000).

2.7. Assessing the effectiveness of *Cordia ecalyculata* Vell. and *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli. crude extracts for obesity treatment

Recently weaned male Swiss mice (12 ± 2 g) were distributed into three groups with five animals each. The first group of animals was treated daily with 10 mL/kg bw (body weight) sterile water, the second group was treated with 2000 mg/kg bw of the *Cordia ecalyculata* crude extract, and the third group was treated with 2000 mg/kg bw of *Echinodorus grandiflorus* crude extract. Both extracts were dissolved in sterile water and administered by gavage in the amount of 10 mL/kg bw once a day for 15 consecutive days. Body mass and the amount of food and water consumed were recorded daily. At the end of the treatment, increases in body mass, the mean mass of the food consumed, and the mean volume of water ingested were all calculated. At the conclusion of the study, the animals were euthanized and bone marrow and blood were collected for completion of the Micronucleus Test and the cytotoxicity test.

2.8. Statistical analysis

The data were analyzed using the one-way ANOVA test and the Student's *t*-test. All tests were evaluated at a 5% significance level. Results are expressed as mean ± SD of three independent experiments. The results were considered positive when there was a statistically significant increase ($P < 0.05$) in values for at least one dose, which exceeded the negative control range (Tice et al., 1998).

3. Results

A significant ($P < 0.05$) increase was observed in the average frequency of micronucleated erythrocytes in peripheral blood in mice treated with the *Cordia ecalyculata* or *Echinodorus grandiflorus* extracts compared to the negative control. Variations were not observed in the frequency of micronucleated erythrocytes ($P > 0.05$) between the different concentrations of the extracts used for the treatments (Table 1). This reveals increment in the liberation of micronucleated erythrocytes, of the bone marrow compartment for the peripheral blood, descending of cells that had a defect in the division mechanism or chromosomal breaks. The increment can be attributed to the interference of the extracts in the bone marrow compartment acting in a dose-independent way.

There were no significant differences ($P > 0.05$) in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes for either extract

Table 1
Average frequency of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of Swiss mice verified 24 h after the treatments.

Treatments	Doses	Frequency of micronucleated erythrocytes/2000 cells ^a
Negative control (H ₂ O)	10 mL/kg bw	18 ± 2.683
Doxorubicin	5 mg/kg bw	37.667 ± 3.830 ^b
<i>Cordia ecalyculata</i>	500 mg/kg bw	22.167 ± 3.545 ^b
<i>Cordia ecalyculata</i>	1000 mg/kg bw	21.500 ± 2.429 ^b
<i>Cordia ecalyculata</i>	2000 mg/kg bw	21.167 ± 2.401 ^b
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	500 mg/kg bw	27.500 ± 5.753 ^b
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	1000 mg/kg bw	26.333 ± 4.676 ^b
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	2000 mg/kg bw	26.333 ± 5.922 ^b

^a In each treatment analyzed 12 000 erythrocytes of six mice.

^b $P < 0.05$ compared with negative control, Student's *t*-test.

Table 2

Average frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE/2000 PCEs) and the PCE/NCE ratio observed in the bone marrow of male Swiss mice, 24 h after the treatments.

Treatments	Doses	Mean of MNPCE/2000 PCEs	Mean of PCE/NCE ratio
Negative control (H ₂ O)	10 ml/kg bw	7.667 ± 2.066	2.577 ± 0.218
Doxorubicin	5 mg/kg bw	35.000 ± 6.066	2.287 ± 0.180
<i>Cordia ecalyculata</i>	500 mg/kg bw	8.167 ± 1.329	2.648 ± 0.145
<i>Cordia ecalyculata</i>	1000 mg/kg bw	10.500 ± 2.345	2.849 ± 0.196*
<i>Cordia ecalyculata</i>	2000 mg/kg bw	8.667 ± 2.422	3.157 ± 0.370*
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	500 mg/kg bw	8.833 ± 1.722	2.618 ± 0.199
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	1000 mg/kg bw	10.500 ± 2.429	2.663 ± 0.213
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	2000 mg/kg bw	9.500 ± 2.811	2.631 ± 0.146

* $P < 0.05$ compared with negative control, Student's *t*-test.

treatment when compared to the negative control. Also, variations were not observed ($P > 0.05$) in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes between the different concentrations of the phytotherapeutics (Table 2). These results indicate that the extracts in acute treatment (24 h) do not cause significant increase (in agreement with statistical analysis) in the amount of the clastogenic and/or aneugenic damage in precursory cells of the erythrocytes, in the hematopoietic tissue.

On one hand a significant difference was not observed in the PCE/NCE ratio after 24 h of treatment with *Echinodorus grandiflorus* extract, relative to the negative control ($P > 0.05$). However, on the other hand it was observed that the treatment with the *Cordia ecalyculata* extract at concentrations of 1000 and 2000 mg/kg bw resulted in a PCE/NCE ratio that was larger ($P < 0.05$) than the negative control (Table 2). These results are important because they show that the extracts analyzed in our experimental conditions do not cause myelodepletion.

A difference was also not observed in the DNA damage scores ($P > 0.05$) in the mice treated with *Cordia ecalyculata* or *Echinodorus grandiflorus* when compared with negative control. In addition, differences were not verified in the DNA damage score between the different extract concentrations. The Comet Assay is very sensitive to detect primary DNA damage that is under the effectiveness of repair mechanisms.

After 15 days of daily treatment, a dose of 2000 mg/kg bw of either phytotherapeutic did not reduce body mass gain or the amount of food consumed by Swiss mice when compared with the negative control ($P > 0.05$). The group treated with *Echinodorus grandiflorus* extract showed a small increase in body mass, while the mice treated with *Cordia ecalyculata* exhibited a small reduction in the consumption of water (Fig. 1). Therefore, it was inferred that in these experimental conditions the extracts did not present anorexigen activity.

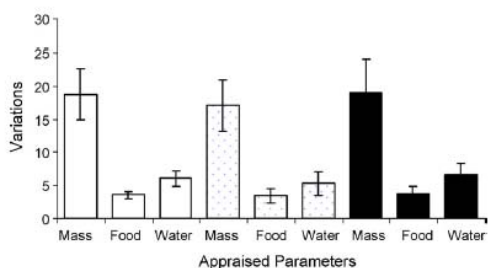


Fig. 1. Evaluation of the effectiveness of the crude extracts of *Cordia ecalyculata* (with the bars with texture) and *Echinodorus grandiflorus* (black bars) in terms of body mass reduction (g), food consumption (g), and ingestion of water (mL) in Swiss mice (each group has 5 animals) treated for 15 consecutive days with 2000 mg/kg bw/day of crude extracts. Negative control (white bars). Each bar represents the result expressed as mean ± SD after 15 consecutive days.

The chronic treatment of mice with the daily dose of 2000 mg/kg bw of the crude extracts for 15 consecutive days did not result in an increase ($P > 0.05$) in the mean MNPCEs compared to the negative control. In these mice, it was also observed that the PCE/NCE ratio did not decrease when compared with negative control; there was a small increase of the PCE/NCE values in the mice treated with *Cordia ecalyculata* ($P < 0.05$). In the peripheral blood, the average micronucleated erythrocytes in the animals treated with the crude extracts were superior ($P < 0.05$) to those of the animals belonging to the negative control group (data not shown). In this experiment the highest sample dose recommended for conduction of genotoxicity research with mouse was used and both extracts did not display cumulative activity that interferes in the myeloid tissue leading to genotoxic and cytotoxic effects.

4. Discussion and conclusion

The frequency of micronucleated erythrocytes in animals treated with phytotherapeutic crude extract for 24 h was larger than the negative control, but the magnitude of these differences and the absence of a dose–effect led us to disregard this result. Ress et al. (2002) detected the lack of dose–response effect and only a small increase in the micronucleus formation for the tested sample. Therefore, the authors considered the result as weak positive. According to The Guidelines for the Testing of Chemicals (OECD) (1997), to consider the results of a genotoxic assay to be positive, the values of the tests should be larger than the values of the negative control, and there should be observable variations in the results for different doses of the tested sample. But to interpret the result we should not just rule in a parameter as the statistical significance, or even, the increase in the damage verified in the treatments with tested samples in relation to the negative control; the decisions should take into consideration pharmacokinetics and physiologic aspects (Krishna and Hayashi, 2000). The sensibility and effectiveness of the tests should be balanced, and, for great certification, the positive results should be further submitted to other tests with variation in the protocol to evaluate other target tissue, treatment regime and metabolic pathway (Galloway, 1996; Kirkland et al., 2005). The Micronucleus Test in bone marrow of rodents should be interpreted with caution and whenever possible to be associated with other genotoxic tests, in spite of an integrate battery of genotoxic tests and the efficiency in the exclusion of false positive. Most of the times, the increase in the micronucleus frequency cannot directly be related to genotoxic effect of the testing samples, because the physiologic interference as alteration of the corporal temperature, toxicity, alteration of the hematopoiesis, stimulate the cellular division and/or blockage of the protein synthesis (Fusco et al., 1996; Tweats et al., 2007). The increase in micronucleated erythrocytes in peripheral blood relative to the bone marrow PCEs was expected. According to Udroui (2006), micronucleated erythrocytes are not quickly removed from the peripheral blood of mice. In the bone marrow it was not observed any significant vari-

ations ($P < 0.05$) in number of MNPCs either in the groups treated with crude extracts (for 24 h and for 15 days) nor in the negative control group. While Krishna and Hayashi (2000) affirm that an increase in MNPCs related to a dose increase is a criterion for a positive assay, such an increase was not verified in our study. Konan et al. (2007) reported a significant increase ($P < 0.05$) of MNPCs in relation to the negative control in their mouse experiments with 2000 mg/kg bw hydroethanolic extract of *Anacardium occidentale*, a plant with a phytochemical profile similar to *Cordia ecalyculata*. The lack of agreement of our result could be due to differences in the concentrations of the constituent fractions of the extracts.

The significant increase of micronucleated erythrocytes in peripheral blood both after 24 h and after 15 days of treatment, and the lack of significant alterations in MNPC frequency in the bone marrow in this same period, may be due to the weak clastogenic and/or aneugenic action of some components of the crude extracts. This clastogenic activity would provoke a small increase in MNPCs in the bone marrow; as micronucleated erythrocytes are not destroyed in the peripheral blood of mice, the MNPCs would accumulate in the peripheral blood. Witt et al. (2000) reported a similar result in mice that were acute (3 days) and chronically (13 weeks) treated with 3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene (TCAB) and 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene (TCAOB).

Crude extracts did not increase the DNA damage scores in the leukocytes of the Swiss mice compared to the negative control. Lopes et al. (2000) also verified a similar result in blood, liver, and kidney cells treated with the extract of *Echinodorus macrophyllus*. Even at high concentrations, they observed only a weak genotoxic activity. The absence of genotoxic damage can be attributed to the prevalence of antioxidant substances in the extracts. Both the extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus* contain saponins, steroids, and flavonoids. These compounds possess potential antigenotoxic, antioxidant, and chemopreventive properties (Ahmadi et al., 2008; Utescha et al., 2008; Zhang et al., 2008, 2009).

In order to assess the effectiveness of the crude extracts for the treatment of obesity, it was verified that animals treated with *Echinodorus grandiflorus* had a small increase in water consumption. This finding could be associated with a possible diuretic effect of this phytotherapeutic. Cardoso et al. (2003) verified that a 5% aqueous extract of this phytotherapeutic possesses a potent diuretic activity in Swiss mice. This property could possibly lead people to believe that the use of the plant actually reduces body mass. In the conditions of our experiments, the crude extracts of *Echinodorus grandiflorus* did not reduce food ingestion or the body mass of the treated animals. In contrast, it was observed a small increase of the corporal mass. Lopes et al. (2000) observed that treatment with a low concentration (3–23 mg/kg bw) of a lyophilized aqueous extract of *Echinodorus macrophyllus* reduces the body mass in 40% compared to the negative control. At a high dose (297 mg/kg bw), the reduction in body mass was only 5%. These results can be due to the presence of pharmacological active compounds that only are activate in low concentrations, or the presence of other intermediate that interferes in the mode of action at high concentrations or with the proper active pharmacological substance. As the authors did not evaluate the food intake for the animals, it is not possible to determine the mechanism of action. Other possible explanations for our result are that we worked with a high dose (2000 mg/kg bw) or that the *Echinodorus grandiflorus* does not contain the same chemical profile of *Echinodorus macrophyllus* that interfere with physiologic mechanisms related to the regulation of body mass.

The obtained results for *Cordia ecalyculata* are also in opposition to beliefs of people in general, and it was not observed any reduction of body mass, food ingestion, or water consumption. Siqueira et al. (2006) reported similar results in rats treated with a concentration of 20 mg/kg bw for 13 days.

In the cytotoxicity test, it was not observed a significant reduction in PCEs in the treated mice relative to the negative control. However, it was observed an increase in the PCE/NCE ratio in the group treated with *Cordia ecalyculata* (1000 mg and 2000 mg/kg bw) for either the acute treatment (24 h) or the chronic treatment (15 days), in comparison with the negative control. According to Rapisarda et al. (1997), cytotoxic effects observed in other species of *Cordia* through chronic treatment were attributed to the presence of pyrrolizidine alkaloids. This class of compounds was not detected in *Cordia ecalyculata*. Arisawa et al. (1994) verified that the methanolic extract of the branches and leaves of *Cordia salicifolia* showed cytotoxic activity against cancer cells. Caparroz-Assef et al. (2005) have affirmed that the oral toxicity of the *Cordia salicifolia* extract is low and no evidence was found that may pose risks after prolonged doses. Consistent with our data, Lopes et al. (2000) found that *Echinodorus macrophyllus* does not possess mutagenic, cytotoxic, or genotoxic properties.

The proportion of PCEs is the endpoint to access cytotoxicity, to demonstrate chemical exposure in target cell. The bone marrow toxicity is characterized for PCEs reduction. The continuous decrease in the PCE/NCE ratio may be due to the inhibition of cell division, erythroblast death, removal of damaged cells, and/or dilution of the existing cell pool with newly formed cells (Krishna and Hayashi, 2000; Guidelines for the Testing of Chemicals (OECD), 1997; Venkatesh et al. (2007). Adler (1984) proposed an expected relationship of 1:1 among PCE/NCE and recommends not proceeding experiment if the PCE/NCE ratio is smaller than 25%. Gollapudi and McFadden (1995) estimated an expected frequency of 50–60% PCEs relative to the total erythrocytes in the bone marrow. The PCE/NCE ratio is a preliminary parameter for detection of acute as well as chronic damage in hematopoietic tissue. The proliferation, as well as repression of cellular proliferation can be evaluated. Considering an initial test and tissue specificity, it should be accompanied by other indicative observations of toxicity, as alterations of the one of the clinical signs (diarrhea, weight loss, agitation, hispid hair, convulsions, tremors, dyspnea among other) and mortality (Caparroz-Assef et al., 2005). In case of positive result it is interesting to investigate new target tissues and the mechanism of action of the test samples. In our study, all of the values are above 1.0, which allows us to deduce that the tested substances are provoking either PCE proliferation or NCE destruction. As the negative control also possesses value above 1.0, this deduction is weakened.

Treatment with doxorubicin 5 mg/kg bw induced genotoxic damage with no observable cytotoxicity in the myeloid tissue. We consider two different explanations for that: at this concentration and treatment period (24 h) the drug did not reach cytotoxic level in this tissue. Venkatesh et al. (2007) observed a significant reduction in the PCE/NCE ratio that reached pick maximum after 72 h for the same concentration of doxorubicin (5 mg/kg bw), otherwise, the study of Resende et al. (2007) observed that at 90 mg/kg bw doxorubicin did not induce significant reduction in the percentage PCEs in myeloid tissue of Wistar rats. Another hypothesis is that the doxorubicin could have destroyed, with same intensity, PCE with NCE in the bone marrow compartment. However, it is not possible to undertake more microscopic analysis to confirm this hypothesis.

In conclusion, the crude extracts of both *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*, in the tested doses and therapeutic systems evaluated do not possess clastogenic or cytotoxic effects against PCEs in the bone marrow of Swiss mice (for treatment of 24 h and 15 days), but do present weak clastogenic activity (for treatment of 24 h and 15 days) in the peripheral blood. It was also concluded that the crude extracts are not effective for the treatment of obesity and do not cause genotoxicity (24 h). Due to the extensive use of these medicinal plants and their therapeutic potential, further studies with the chromatographic fractions and pure compounds of these extracts should be undertaken to fully elucidate

both the compounds responsible for the activities and their mechanisms of action.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to Luiz Augusto da Costa Júnior and Sueli Aparecida Neves and Rubens Salomão de Campos for their technical assistance. This work was sponsored by, CNPq, CAPES, FAEPA, HCFMRP, SEEGO, CPMGO-AS and FMRP.

References

- Adler, I.D., 1984. Cytogenetic tests in mammals. In: Venitt, S., Parry, J.M. (Eds.), *Mutagenicity Testing, A Practical Approach*, 212(1). IRL Press, Oxford, pp. 275–306.
- Ahmadi, A., Hosseini-mehr, S.J., Naghshvar, F., Hajir, E., Ghahremani, M., 2008. Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Archives of Pharmacological Research* 31, 794–797.
- Aleisa, A.M., Al-Rejaie, S.S., Bakheet, S.A., Al-Bekari, A.M., Al-Shabanah, O.A., Al-Majed, A., Al-Yahya, A.A., Qureshi, S., 2007. Effect of metformin on clastogenic and biochemical changes induced by adriamycin in Swiss albino mice. *Mutation Research* 634, 93–100.
- Arisawa, M., Fujita, A., Hayashi, T., Hayashi, K., Ochiai, H., Morita, N., 1994. Cell growth inhibition of KB cells by plant extracts. *Natural Medicines* 48, 339–348.
- Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M.J., 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England Journal of Medicine* 348, 1625–1638.
- Caparroz-Assef, S.M., Grespan, R., Batista, R.C.F., Bersani-Amado, F.A., Baroni, S., Dantas, J.A., Cuman, R.K.N., Bersani-Amado, C.A., 2005. Toxicity studies of *Cordia salicifolia* extract. *Acta Scientiarum Health Science* 27, 41–44.
- Cardoso, G.L.C., Pereira, N.A., Lainetti, R., 2003. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*, [Cham. e Schl.] Mitch, Alismataceae). *Revista Brasileira de Farmácia* 84, 5–7.
- Cruz, G.L., 1995. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*, 5th ed. Bertrand, Rio de Janeiro.
- Duarte, M.G.R., Soares, I.A.A., Brandão, M., Jácome, R.L.R.P., Ferreira, M.D., Silva, C.R.F., Oliveira, A.B., 2002. Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana in vitro de plantas invasoras. *Revista Lecta, Bragança Paulista* 20, 177–182.
- Ernst, E., 2004. Risks of herbal medicinal products. *Pharmacoeconomics and Drug Safety* 13, 767–771.
- Fusco, J.C., Afshari, A.J., George, M.H., DeAngelo, A., Tice, R.R., Salman, T., Allen, J.W., 1996. In vivo genotoxicity of dichloroacetic acid: evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 27, 1–9.
- Galloway, S.M., 1996. The micronucleus test and NTP rodent carcinogens: not so many false negatives. *Mutation Research* 352, 185–188.
- Gewirtz, D.A., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology* 57, 727–741.
- Gollapudi, B.B., McFadden, L.G., 1995. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Research* 347, 97–99.
- Guzmán, A., de Henestrosa, A.R.F., Marín, A.P., Ho, A., Borroto, J.I., Carasa, I., Pritchard, L., 2007. Evaluation of the genotoxic potential of the natural neurotoxin tetrodotoxin (TTX) in a battery of in vitro and in vivo genotoxicity assays. *Mutation Research* 634, 14–24.
- Hartmann, A., Speit, G., 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters* 90, 183–188.
- Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., Müller, L., 2005. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research* 584, 1–256.
- Kobayashi, J., Sekiguchi, M., Shimamoto, S., Shigemori, H., Ohsaki, A., 2000. Echinophyllins C-F, new nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Journal of Natural Products* 63, 1576–1579.
- Konan, N.A., Bacchi, E.M., Lincopan, N., Varela, S.D., Varanda, E.A., 2007. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Ethnopharmacology* 110, 30–38.
- Kopelman, P.G., 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635–643.
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research* 455, 155–166.
- Lopes, L.C., Albano, F., Laranja, G.A.T., Alves, L.M., Silva, L.F.M., Souza, G.P., Araujo, I.M., Nogueira-Neto, J.F., Felzenszwalb, I., Kovary, K., 2000. Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicology Letters* 116, 189–198.
- Manns, D., Hartmann, R., 1993. Echinodol: a new cembrene derivative from *Echinodorus grandiflorus*. *Planta Medica* 59, 465–466.
- Mei, N., Guo, L., Liu, R., Fuscoe, J.C., Chen, T., 2007. Gene expression changes induced by the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in liver of Big Blue rats. *BMC Bioinformatics* 8, 54.
- Mello, M.L.S., 1997. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Brazilian Journal Genetics* 20, 257–264.
- Menghini, L., Epifano, F., Leporini, L., Pagiotti, R., Tirillini, B., 2008. Phytochemical investigation on leaf extract of *Cordia salicifolia* Cham. *Journal of Medicinal Food* 11, 193–194.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 1997. Guidelines for the testing of chemicals: mammalian erythrocyte micronucleus test. Section 4, Guideline 474.
- Rapisarda, A., Ragusa, S., De Pasquale, A., 1997. Hepatotoxic effect of the leaves of some *Cordia* species. *Acta Horticulturae Leuven* 223, 237–239.
- Resende, F.A., Alves, J.M., Munari, C.C., Senedese, J.M., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Tavares, D.C., 2007. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutation Research* 634, 112–118.
- Reiss, N.B., Witt, K.L., Xu, J., Haseman, J.K., Bucher, J.R., 2002. Micronucleus induction in mice exposed to diazoaminobenzene or its metabolites, benzene and aniline: implications for diazoaminobenzene carcinogenicity. *Mutation Research* 521, 201–208.
- Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., Van der Woude, H., Jeurissen, S.M.F., Schutte, M.E., Alink, G.M., 2005. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation Research* 574, 124–138.
- Sinha, D., Dey, S., Bhattacharya, R.K., Roy, M., 2007. In vitro mitigation of arsenic toxicity by tea polyphenols in human lymphocytes. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 26, 207–220.
- Siqueira, V.L.D., Cortez, D.A.P., Oliveira, C.E., Nakamura, C.V., Bazotte, R.B., 2006. Pharmacological studies of *Cordia salicifolia* Cham in normal and diabetic rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49, 215–218.
- Stich, H.F., Curtis, J.R., Parida, B.B., 1982. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *International Journal of Cancer* 30, 553–559.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206–221.
- Tice, R.R., Furedi-Machacek, M., Satterfield, D., Udumudi, A., Vasquez, M., Dunning, J.K., 1998. Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the p53 gene. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 31, 113–124.
- Tweats, D.J., Blakey, D., Heflich, R.H., Jacobs, A., Jacobsen, S.D., Morita, T., Nohmig, T., O'Donovan, M.R., Sasaki, Y.F., Sofuni, T., Tice, R., 2007. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutation Research* 627, 78–91.
- Udroiu, I., 2006. Feasibility of conducting the micronucleus test in circulating erythrocytes from different mammalian species: an anatomical perspective. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47, 643–646.
- Utescha, D., Feige, K., Dasenbrock, J., Broschard, T.H., Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Lines, T.C., 2008. Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. *Mutation Research* 654, 38–44.
- Venkatesh, P., Shantala, B., Jagetia, G.C., Rao, K.K., Baliga, M.S., 2007. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: a micronucleus study. *Integrative Cancer Therapies* 6, 42–53.
- Witt, K.L., Zeiger, E., Tice, R.R., Angélique, P.J.M., Van Birgelen, A.P.J.M., 2000. The genetic toxicity of 3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene and 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene: discordance between acute mouse bone marrow and subchronic mouse peripheral blood micronucleus test results. *Mutation Research* 472, 147–154.
- Zhang, Q.H., Wu, C.F., Duan, L., Yang, J.Y., 2008. Protective effects of total saponins from stem and leaf of *Panax ginseng* against cyclophosphamide-induced genotoxicity and apoptosis in mouse bone marrow cells and peripheral lymphocyte cells. *Food and Chemical Toxicology* 46, 293–302.
- Zhang, R., Kang, K.A., Piao, M.J., Ok ko, D., Wang, Z.H., Chang, W.Y., Ho jin you, H.J., Lee, I.K., Kim, B.J., Kang, S.S., Hyun, J.W., 2009. Preventive effect of 7,8-dihydroxyflavone against oxidative stress induced genotoxicity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32, 166–171.



Human and Experimental Toxicology
000(00) 1–11
© The Author(s) 2009
Reprints and permission: <http://www.sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav>
DOI: 10.1177/0960327109358732
het.sagepub.com
SAGE

An evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of the anti-obesity drugs sibutramine and fenproporex

Cristiano José da Silva¹, José Ernesto dos Santos² and Catarina Satie Takahashi^{1,3}

Abstract

Anti-obesity medications deserve special considerations at the present time due to an increasing number of overweight and obese people who require these therapeutic alternatives. Obesity is positively associated with several chronic illnesses, including cancer. In this work, we evaluated the possible genotoxic and/or cytotoxic actions of two drugs, sibutramine and fenproporex, in the doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight (bw), administered intraperitoneally in male Swiss mice. The genotoxic effect was analyzed by comet assay and micronucleus test. We found that both drugs increased the frequency of genotoxic damage in Swiss mice, but did not present cytotoxic activities towards the polychromatic erythrocytes of the bone marrow of these animals.

Keywords

anti-obesity, genotoxic, cytotoxic, fenproporex, sibutramine

Introduction

The growing number of overweight and obese people worldwide represents one of the largest public health concerns at the beginning of the 21st century. These conditions are commonly assessed using the body mass index (BMI), and people that have high BMI (≥ 25 kg/m²) are more susceptible to the development of chronic diseases, including several types of cancer.^{1–4} According to the projections for the year 2015, approximately 2.3 billion adults will be overweight, and more than 700 million will be obese.^{1,5} In Brazil, The Research of Family Budget, conducted during 2002–2003, found that 40% of adults were overweight (BMI ≥ 25 kg/m²), and of these, 22% were obese (BMI ≥ 30 kg/m²), including 8.9% males and 13.1% females.⁶

As startling as the increase in the number of overweight and obese people in the world population is the increase in the consumption of anti-obesity drugs, mainly in developing countries.⁷ These drugs are often acquired without medical prescriptions and are indiscriminately used. Additionally, some medicines sold as anti-obesity preparations are called natural products but contain one or more anti-obesity drugs

in their composition.^{8–10} Anti-obesity drugs are among the four most commonly consumed drugs by the Brazilian population according to a study in 2005 by The Domicile Survey on Use of Psychotropic Drugs in Brazil.¹¹ The popularization of the consumption of anti-obesity drugs has made Brazil world's largest consumer of these drugs. In 2005, consumption was 12.5 defined daily dosages (DDD), followed by Argentina with 11.8 DDDs, Korea with 9.8 DDDs and United States with 4.9 DDDs. This reality has prompted some international fiscal agencies to

¹ Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, São Paulo University, São Paulo, Brazil

² Department of Medical Clinic, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, São Paulo University, Brazil

³ Department of Biology, Faculty of Philosophy Sciences and Letters of Ribeirão Preto, São Paulo University, São Paulo

Corresponding author:

Cristiano José da Silva, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, São Paulo University, Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, State: São Paulo, Brazil.

Email: profeta@usp.br

recommend that Brazilian health authorities exercise more effective control in the commercialization of these drugs and crack down on illegal markets.⁸

Although tests are recommended by regulatory agencies worldwide, many of these commercialized drugs have not been investigated regarding their possible genotoxic hazards.¹² There are many disagreements in studies related to the safety of anti-obesity drugs.¹³ The studies of these medicines have evaluated the efficacy of the drugs in reducing body mass without much interest in their possible adverse effects. The indiscriminate use of these drugs, associated with increased periods of therapeutic use, suggest that the pattern of use could increase the rates of genetic damage. As increases in genetic damage are positively correlated with carcinogenesis,^{14,15} anti-obesity drugs can increase the cancer index of the exposed population.

The use of anti-obesity drugs has been very common mainly to provide physical well-being and to increase performance. There is little information regarding the adverse effects provoked by the chronic use of these substances. The adverse effects of drugs used to treat or control obesity and the limited data regarding their chronic use highlight a need for the discovery of safe and effective pharmaceuticals for treating or controlling obesity.¹⁶

Evidence that in overweight or obese adult persons the incidence of cancer is greater than in persons with a normal body mass index ($BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$) and the lack of conclusive evidence on the associated mechanisms^{4,17} indicate the need for a better evaluation of these drugs with regard to their possible effects on genetic material. In this study, we evaluated the possible effects of the anti-obesity drugs fenproporex and sibutramine on cellular processes that may result in carcinogenicity and evaluated the cytotoxic and genotoxic effects of these drugs.

Materials and methods

The evaluation of the possible genotoxic and cytotoxic effects of drugs is frequently accomplished using accurate and accepted tests over short durations by the regulatory agencies that authorize the use of chemicals worldwide.¹⁴ In this study, we used the micronucleus test to evaluate possible clastogenic and aneugenic effects and the comet assay to evaluate DNA single-strand breaks and DNA double-strand breaks. The cytotoxic effects of the anti-obesity drugs fenproporex and sibutramine were found by

comparing the relationship between polychromatic erythrocytes (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) in the bone marrow of mice. As an experimental model for the *in vivo* study, we used Swiss mice (*Mus musculus*) as they have been adopted as a standard for regulatory agencies in several countries because genotoxicity and/or carcinogenicity in rodents indicate an increased risk of human carcinogenicity.^{12,18} All experiments involving animals were carried out in full compliance with best laboratory practice guidelines.

Chemicals

- Fenproporex: (\pm)-3-(α -methylphenethylamino) propionitrile hydrochloride, CAS Registry: 15686-61-0 – Lot n° 7CG5010, Genix Indústria Farmacêutica Ltda., Anápolis, GO, Brazil.
- Sibutramine: (\pm)-1-(*p*-chlorophenyl)- α -isobutyl-*N,N*-dimethylcyclobutanemethylamine hydrochloride monohydrate, CAS Registry: 106650-56-0 – Lot n° IF076506*2, Deg Importadora de Produtos Químicos Ltda. São Paulo, SP, Brazil.
- Doxolem®: Chlorohydrate of doxorubicin, CAS Registry 23214-92-8 – Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, Pindamonhangaba, SP, Brazil. We used as a positive control the anthracycline antibiotic doxorubicin, commonly used to treat a wide variety of cancers. The primary mechanism of drug action is likely to be through an interaction with topoisomerase II. The effects of doxorubicin involve the production of free radicals, an increase in DNA strand breakage, chromosomal aberrations and increases in micronucleus formation *in vitro* and *in vivo*.¹⁹⁻²¹

Mouse treatment protocol

The Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, approved the protocols used in this study (Protocol n°032/2006). Male Swiss mice (4–6 weeks old) were obtained from the Animal House of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, and the animals were housed individually in polypropylene cages covered with metallic grids in a room maintained at $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 55% \pm 10% humidity and with a 12-hour light-dark cycle. The animals were fed commercial NUVILAB CR1 chow (Colombo PR, Brazil) and water *ad libitum* for a 5-day acclimation period.

Mice were randomly divided into eight groups with 6–8 male animals each, and intraperitoneally received either 10 mL/kg body weight (bw) distilled water or 5 mg/kg bw doxorubicin, fenproporex or sibutramine at each of the stated doses. Mice were euthanized by cervical dislocation 24 hours after administration. Four additional groups with 6–7 male animals each receiving distilled water, doxorubicin (5 mg/kg bw) or a high dose of fenproporex or sibutramine (40 mg/kg bw) were euthanized 48 hours after administration. Based on a preliminary study, fenproporex or sibutramine doses of 10, 20 and 40 mg/kg bw were selected for accomplishment of both tests.

Mouse bone-marrow micronucleus test

Immediately after euthanasia, femurs were dissected and bone-marrow was extracted and suspended in tubes containing 2 mL of pre-warmed (37°C) fetal calf serum (Biological Industries). The tubes were centrifuged at 180g for 5 min and the supernatant discarded. The pellet was re-suspended in two to three drops of fetal calf serum and spread on slides (two slides per animal). The smears were fixed with methanol and stained with 5% May Grünwald-Giemsa. The slides were coded and examined via light microscopy. Two slides per animal were prepared, and 1000 PCE per slide were analyzed for the presence of micronuclei. The relative proportion of PCE and NCE was determined by counting a total of 200 erythrocytes per slide. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) out of 2000 PCE was determined. The data were analyzed using the Student's *t*-test and an ANOVA. The result was considered positive when there was a statistically significant increase ($p < .05$) in the frequency of MNPCE for at least one dose that exceeded the negative control range.^{14,22,23}

Mouse peripheral blood micronucleus test

Peripheral blood was spread on microscope slides and air-dried. The next day, the slides were stained via the Feulgen reaction. After the fixation procedure, the slides were kept in 5 N HCl for 20 min at room temperature. After hydrolysis, the slides were washed three times in distilled water and transferred into Schiff's reagent for 60 min, washed and stained with Fast Green for 25 min for cytogenetic analysis.²⁴⁻²⁷

Comet assay

The Single-Cell Electrophoresis Assay, or comet assay, was performed under alkaline conditions. Briefly, 15 μ L of each peripheral blood sample, obtained 3, 24 and 48 hours after treatment, were mixed with 160 μ L of 0.5% low-melting-point agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37°C and layered onto a conventional microscope slide pre-coated with 1.5% normal-melting-point agarose (Invitrogen). The slides were placed overnight in cold, freshly prepared lysing solution (2.5 mol/L NaCl [sodium chloride], 100 mmol/L EDTA [ethylenediaminetetraacetic acid] disodium salt, 10 mmol/L, pH 10, Tris buffer, 10% DMSO [dimethylsulfoxide] and 1% Triton X-100) and then into a horizontal electrophoresis buffer (1 mmol/L EDTA disodium salt and 0.3 mol/L NaOH [sodium hydroxide]), at 4°C for 20 min. Using the same buffer, electrophoresis was performed at 25 V and 300 mA for 20 min. After electrophoresis, the slides were rinsed three times in neutralizing buffer (0.4 mol/L, pH 7.5, Tris-HCl [hydrochloric acid]), fixed for 5 min in absolute alcohol, air-dried, and stored at room temperature.²⁸⁻³¹

Immediately before analysis, DNA was stained with 30 μ L of 20 μ g/mL ethidium bromide. The slides were examined with a $\times 40$ objective using an epilluminated fluorescence microscope (Olympus-Bx 60). Coded slides were scored in a blind test, and 200 blood cells were randomly analyzed for each animal (100 cells per slide from two slides per animal). The cells were scored visually into five classes according to tail size from undamaged (0) to maximally damaged (4), and a value (damage index) was assigned to each comet according to its class. The damage index thus ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells \times 4). The comets with a 'cloudy' appearance or a very small head and a tail like a balloon (necrotic/apoptotic cells) were excluded from the evaluation under the assumption that they represented dead cells.²⁸⁻³¹

Statistical analysis

The data were analyzed using The One-Way ANOVA Test and the Student's *t*-test. All of the tests considered a 5% significance level. The results are expressed as means \pm SD of three independent experiments. A result was considered positive when there was a statistically significant increase ($p < .05$)

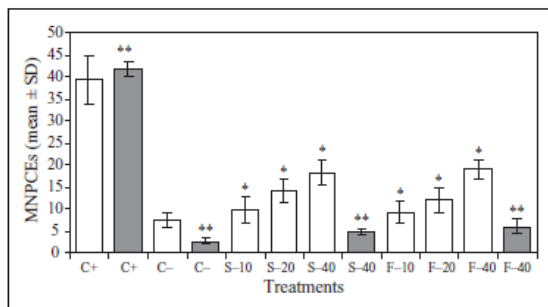


Figure 1. The average frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE/ 1000 polychromatic erythrocytes [PCE]), observed in the bone marrow of male Swiss mice, 24 (white bars) and 48 (gray bars) hours after treatment. C+ (doxorubicin 5 mg/kg body weight [bw]), C- (distilled water), S-10 (sibutramine, 10 mg/kg bw), S-20 (sibutramine, 20 mg/kg bw), S-40 (sibutramine, 40 mg/kg bw), F-10 (fenproporex, 10 mg/kg bw), F-20 (fenproporex, 20 mg/kg bw) and F-40 (fenproporex, 40 mg/kg bw). *Values significantly different from the negative control ($p < .05$) used Student's t-test. **Values significantly different compared the groups analyzed at 48 hours with the groups analyzed at 24 hours after treatment ($p < .05$) used Student's t-test.

in values for at least one dose that exceeded the negative control range.³²

Results

The micronucleus test in cells of bone marrow

We observed a significant increase in the average of MNPCE in the groups treated with sibutramine or fenproporex drugs at 10 mg/kg bw, 20 mg/kg bw and 40 mg/kg bw ($p < .05$). When we compared the different concentrations of sibutramine or fenproporex, we found a significant increase in the MNPCE average ($p < .05$), which indicates a dose-response relationship of these drugs (Figure 1).

Examining the bone marrow of the animals 24 hours after treatment with three different concentrations of sibutramine, significant differences in the PCE/NCE ratio were not found ($p > .05$). In the groups treated with fenproporex, we observed increase in PCE/NCE ratio in the groups treated with the concentrations of 20 and 40 mg/kg bw ($p < .05$; Figure 2).

We also observed a significant reduction in the MNPCE averages in the treatments with the negative control, sibutramine or fenproporex, both at the

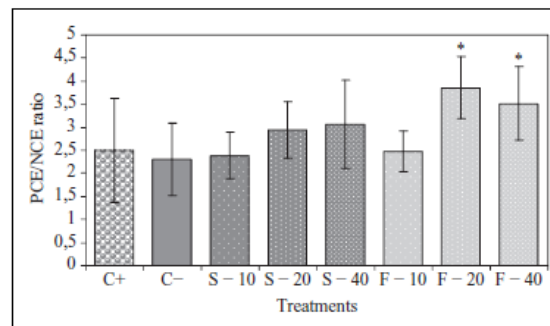


Figure 2. Polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes (PCE/NCE) ratio in bone marrow of Swiss mice 24 hours after treatments. C+ (doxorubicin 5 mg/kg body weight [bw]), C- (distilled water), S-10 (sibutramine 10 mg/kg bw), S-20 (sibutramine 20 mg/kg bw), S-40 (sibutramine 40 mg/kg bw), F-10 (fenproporex 10 mg/kg bw), F-20 (fenproporex 20 mg/kg bw) and F-40 (fenproporex 40 mg/kg bw). *Values significantly different from the negative control ($p < .05$) used Student's t-test.

concentration of 40 mg/kg bw, in analyses performed 48 hours after these treatments ($p < .05$; Figure 1). Analyzing the PCE/NCE ratio after 48 hours of treatment, we did not find a significant difference between the groups treated with sibutramine, fenproporex and the negative control ($p > .05$; data not presented).

The micronucleus test in the peripheral blood

The treatments with sibutramine (10 mg/kg bw, 20 mg/kg bw and 40 mg/kg bw) significantly increased ($p < .05$) the frequency of micronucleated erythrocytes, in the peripheral blood of Swiss mice after 24 hours of treatment. There was not a significant difference ($p > .05$) when we compared the median value of the micronucleated erythrocytes in the group treated with sibutramine at 10 mg/kg bw and the group treated with 20 mg/kg bw. However, the group of animals treated with sibutramine at 40 mg/kg bw had a larger median value of micronucleated erythrocytes than the other two groups treated with this drug.

The treatments with fenproporex (10 mg/kg bw, 20 mg/kg bw and 40 mg/kg bw) also significantly increased the average of the micronucleated erythrocytes ($p < .05$). We did not observe significant differences ($p > .05$) in the average of micronucleated erythrocytes when we compared the different concentrations of fenproporex to one another (Figure 3).

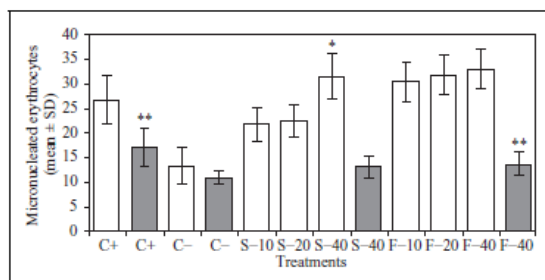


Figure 3. The average frequency of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of Swiss mice found 24 (white bars) and 48 (gray bars) hours after treatment. C+ (doxorubicin 5 mg/kg bw), C- (distilled water), S-10 (sibutramine, 10 mg/kg body weight [bw]), S-20 (sibutramine, 20 mg/kg bw), S-40 (sibutramine, 40 mg/kg bw), F-10 (fenproporex, 10 mg/kg bw), F-20 (fenproporex, 20 mg/kg bw) and F-40 (fenproporex, 40 mg/kg bw). We analyzed 1000 erythrocytes/animal. *Values significantly different of the other concentrations in the same treatment ($p < .05$) used Student's *t*-test. **Values significantly different from the negative control ($p < .05$) used Student's *t*-test.

The sibutramine and fenproporex drugs, at the 40 mg/kg bw concentration, increased the median number of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of Swiss mice after 48 hours of treatment compared with negative control; but the increase went significant ($p < .05$) just for the fenproporex. When we compared the groups analyzed at 48 hours with the groups analyzed at 24 hours after treatment, we found that a significant decrease occurred ($p < .05$) in the median number of micronucleated erythrocytes in the animals treated with sibutramine or fenproporex, in the concentration of 40 mg/kg bw. We did not observe a significant difference ($p > .05$) among the negative control treatment when we compared these two periods. In the positive control treatment, we also observed a significant decrease ($p < .05$) in the median number of micronucleated erythrocytes after 48 hours of treatment (Figure 3).

Comet assay

The animals treated for 24 hours with the sibutramine drug, in all concentrations tested, had significantly larger damage scores (DS) in the DNA of leukocytes than the negative control ($p < .05$). In the group of animals treated with sibutramine at 10 mg/kg bw, the damage score was smaller than in the groups treated with the concentrations of 20 mg/kg bw and 40 mg/kg bw ($p < .05$). In the group treated with 40 mg/kg

Table 1. DNA damage scores (DS) observed for the comet assay in leukocytes of Swiss mice 24 hours after treatment

Treatments	Number of cells analyzed	Damage scores/100 cells
Negative control (H ₂ O)	1600	8.500 ± 2.329
Doxorubicin 5 mg/kg bw	1600	62.400 ^a ± 6.346
Sibutramine 10 mg/kg bw	1200	25.636 ^a ± 2.838
Sibutramine 20 mg/kg bw	1200	44.600 ^a ± 4.477
Sibutramine 40 mg/kg bw	1200	37.000 ^a ± 4.295
Fenproporex 10 mg/kg bw	1400	25.400 ^a ± 5.739
Fenproporex 20 mg/kg bw	1400	46.500 ^a ± 5.503
Fenproporex 40 mg/kg bw	1400	49.300 ^a ± 6.391

^aValues significantly different from the negative control ($p < .05$) used Student's *t*-test.

bw of sibutramine, we observed damage scores significantly smaller than in the group treated with 20 mg/kg bw of this drug ($p < .05$; Table 1).

The animals treated for 24 hours with the fenproporex drug, in all tested concentrations, presented a significant increase in the damage scores in the DNA of leukocytes when compared with the negative control group ($p < .05$; Table 1). The drug fenproporex also induced a significant increase in the damage scores at the of 20 mg/kg bw and 40 mg/kg bw concentrations compared to 10 mg/kg bw ($p < .05$; Table 1).

Evaluating the damage score in the groups treated with sibutramine and the groups treated with fenproporex in the concentration of 40 mg/kg bw, we observed that for both drugs, there was not a significant difference in the damage scores when we compared 3 hours and 24 hours ($p > .05$). We also found that after 48 hours of treatment, a significant reduction in the damage scores occurred, when compared with the other two periods (Figure 4).

We did not observe a significant difference in the damage scores for the negative control in the treatment periods of 3 and 48 hours. For the positive control treatment, the largest damage score was observed 24 hours after treatment and the smallest damage score was observed 48 hours after treatment ($p < .05$; Figure 3).

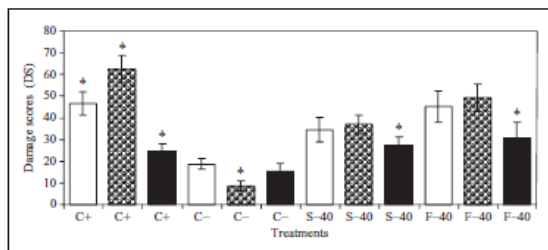


Figure 4. DNA damage scores (DS) in leukocytes of Swiss mice observed 3 (white bars), 24 (bars with spheres) and 48 (black bars) hours after treatment. C+ (doxorubicin, 5 mg/kg body weight [bw]), C- (distilled water), S-40 (sibutramine, 40 mg/kg bw), F-40 (fenproporex, 40 mg/kg bw). The bars are in an ascending order of time. We analyzed 100 cells for experimental repetition. *Value significantly different ($p < .05$) inside of each treatment comparing the three periods (3, 24 and 48 hours) used Student's *t*-test.

Discussion and conclusion

Sibutramine is a beta-phenethylamine metabolized in the liver principally by the CYP3A4 isoenzyme. Its demethylation produces mono- and di-desmethyl sibutramines (M1 and M2), and both are pharmacologically active and are extensively distributed in animal tissues. This drug reaches its plasma peak 1–2 hours (drug) and 3–4 hours (metabolites) after ingestion, with a half-life of 14–16 hours in humans. In studies with mice and rats over 2 years using the M1 and M2 metabolites at a dose 21 times larger than the daily dose for humans (20 mg), a risk of carcinogenicity was not observed.^{7,33,34}

Sibutramine did not exhibit mutagenicity in several assays *in vitro* and in mice.¹² However, the two metabolites presented ambiguous results for mutagenic activity in an Ames test.³⁴ Some genotoxic potential risks justify the need for intensifying studies regarding this drug. The Food and Drug Administration (FDA) does not recommend sibutramine use during pregnancy. Ramzi et al.³⁵ described two patients who used sibutramine during pregnancy; one of the mothers had bleeding and the child was miscarried, and the analysis of the patient showed signs of chromosomal anomalies. In rats, teratogenic evidence was not observed at doses of 1, 2 and 10 mg/day; however, in rabbits heart defects were observed.^{35,36} De Santis et al.³⁷ evaluated 52 women who were exposed to sibutramine in the first trimester of pregnancy and did not find any cases of congenital anomalies in the neonates observed.

Sibutramine acts by inhibiting serotonin, noradrenalin and dopamine reuptake, causing a reduction in food intake, stimulating thermogenesis and increasing the energetic expense.^{38–40} In mice, sibutramine activates β_3 -adrenergic receptors, which stimulate glucose consumption in adipose tissues and increase the metabolic rate, body temperature and consumption of oxygen.¹⁶

Fenproporex is a catecholaminergic drug based on beta-phenethylamine (the central action of all anti-obesity drugs is based in beta-phenethylamine). The beta-phenethylaminic skeleton is also part of the structure of neurotransmitters such as dopamine, norepinephrine and epinephrine. Few studies have evaluated the safety of catecholaminergic agents.⁴¹ Fenproporex is metabolized into amphetamine and methamphetamine. When Moreira et al.⁴² observed the shortage of experimental data related to fenproporex, they performed a study in mice applying a daily rate dose of 15 mg/kg bw and concluded that the drug at this concentration exhibits low teratogenic potential.⁴³

The fenproporex biotransformation occurs through single and double aromatic hydroxylation followed by methylation and degradation of the molecule by *N*-dealkylation into amphetamine.⁴⁴ It reaches the maximum peak in the plasma 2–4 hours post-dose, its effect lasts from 6 to 8 hours, and it is excreted in urine 48 hours after administration. Amphetamine has a half-life of 7 to 14 hours and methamphetamine from 4 to 5 hours.^{7,45} There is evidence that amphetamine can induce dysmorphogenic effects in the development of rat embryos *in vitro*, while also affecting the embryonic-fetal development of mice. In humans, maternal amphetamine exposure during pregnancy is associated with congenital cardiac malformations, biliary atresia, an increased risk of cleft palate, anencephaly, microcephaly, mental retard and low birth weight.⁴²

Mitochondria are the major sites of reactive oxygen species (ROS) generation inside the cell. Conditions of oxidative stress may cause necrosis and apoptosis, degenerative disease, hypertension, aging, cancer, atherosclerosis, inflammation, cystic fibrosis and Parkinson and Alzheimer diseases.^{46–48} During cellular respiration under normal physiological conditions, electrons can escape the respiratory chain and react with oxygen, forming ROS.⁴⁷ This electron leak has been estimated at 0.5%–2% under physiological conditions but may increase significantly under certain conditions.⁴⁸ Due to alterations in metabolism, a considerable amount of DNA damage can be

attributed to the actions of endogenous oxidants originating from metabolic pathways.⁴⁹

One possible explanation for the genotoxicity of these two drugs is indirect action through the induction of oxidative stress. These drugs act in the sympathetic nervous system, which is the largest effector of the thermogenesis on skeletal muscles and adipose tissue. In rodents, stimulation of the sympathetic nervous system causes the release of chemical mediators (such as noradrenaline) that act on the beta-adrenergic receptors of adipose tissue, promoting the release of Cyclic adenosine monophosphate (cAMP), which activates protein kinase A. Protein kinase A in turn phosphorylates Perilipin and may have an acute effect in stimulating lipolysis and activating UCP1, and chronic effects on UCP1 transcription, mitochondrial biogenesis and hyperplasia of adipose tissue.⁵⁰⁻⁵²

2

UCPs are proteins known to decouple the consumption of oxygen from phosphorylation of ADP in adipose tissue and thus promote thermogenesis. If substrates (fat acid and carbohydrates) are oxidized and ATP is not synthesized, the respiratory chain can exist in a reduced state, with the possibility of producing ROS through electron transfer to oxygen. It has been postulated that the function of UCP limits the production of ROS,^{47,48,53} although recent studies affirm that UCP2 reduces the ROS rate inside mitochondria and increases it outside.⁵⁴

These drugs increase the metabolic rate through an increase in the calcium ion (Ca^{2+}) concentration in the intracellular space, optimizing the activity of some enzymes that participate in the citric acid cycle.⁴⁶ There is an increase in formation of ROS, which are usually detoxified by an efficient antioxidant system. An unbalance between ROS generation and detoxification under non-physiological conditions can result in oxidative stress.⁴⁶ Isolated mitochondria of fasting mice (low metabolic rate) reduce the metabolic rate 40% and produce less ROS than the control. This decrease in ROS is related to the decrease in oxidative damage in mice tissues.^{47,50} Based on these observations, we suggest that the genotoxic damage caused by sibutramine and fenproporex are the results of their actions in the sympathetic nervous system. These actions cause alterations in oxidative metabolism that break the balance between ROS generation and detoxification, allowing free radicals to interact with vital macromolecules like proteins and DNA. Quantitative studies of ROS in animals treated with these drugs will be able to further clarify the subject.

The PCE/NCE ratio observed in bone marrow erythrocytes allowed us to estimate the toxicity index

of the test substances in this tissue. According to some researchers, PCE/NCE ratios with values above 1.0 and less than 0.5 indicate cytotoxicity that may or may not be genotoxic.^{55,56} The reduction in the immature erythrocyte proportion relative to total erythrocytes, both in the bone marrow and peripheral blood, is indicative of bone marrow toxicity.²² Adler⁵⁵ proposed an expected one-to-one relationship PCE and NCE and recommended experiments not be performed when the PCE/NCE ratio is less than 25%. Gollapudi and McFadden⁵⁶ affirm that the expected frequency of PCE is 50%–60% of total bone marrow erythrocytes. In our study, all values were allowing us to deduce that the tested substances were causing PCE hyper-proliferation or NCE destruction. As the treatment-negative control (water) also possessed a value greater than 1.0, this deduction loses validity. Adler⁵⁵ warns that, on one hand, an increase in NCE may indicate cytotoxic effects (the death of young cells or the depression of marrow proliferation), while on the other hand, an increase in PCE may indicate regenerative proliferation due to the previous marrow depression.

In this study of cytotoxicity, we did not find differences between the positive and negative controls, but the amount of MNPCE in the positive control was five times greater than the amount of MNPCE in the negative control, indicating that the drug had an effect in the cells of the bone marrow. As all of the values of the PCE/NCE ratio in the treatments were greater than the values for the negative control, we suggest that the drugs destroy NCE and/or stimulate the proliferation bone marrow cells. We also suggest that the differences among the values are not very large due to the short time of exposure. Comparing the treatments with doxorubicin after 24 and 48 hours, the PCE/NCE ratio does not alter, which can be explained by the permanent effect of this drug, which has long half-life; there was a reduction in the PCE/NCE ratio after 48 hours for the other drugs, which can be explained by the absence of a stimulus due to short half-lives of these drugs.⁵⁷

About 12 to 24 hours after application of the drug, the PCE present in the bone marrow are descendants of the cells that were exposed to the agent before cell division, while the pre-existing PCE have moved into the peripheral circulation and transformed into NCE. According to Krishna and Hayashi,¹⁴ bone marrow toxicity is characterized by PCE reduction in the treatments relative to the negative control. In our study, this was not observed. Thus, we can affirm that the

tested substances do not reduce the PCE number in the bone marrow of mice under our experimental conditions. In the treatments with doxorubicin, the MNPCE and (micronucleated normochromatic erythrocytes (MNNCE) frequencies increased with time. Aleisa et al.¹⁹ also found a larger MNPCE value 48 hours after treatment with doxorubicin, and a larger MNNCE value after 72 hours.

The micronucleus test has an important function in the development process of new drugs. The evaluation of the micronucleus frequency *in vivo* is a primary genotoxicity test recommended by regulatory agencies worldwide to determine the possible risks of drugs for human health by detecting clastogenic and aneugenic effects.^{14,58} When we compared the median number of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of animals treated with sibutramine and fenproporex (40 mg/kg bw, 24 and 48 hours), we found that there was a decrease in the median number of micronucleated erythrocytes 48 hours after treatment relative to the number 24 hours after the treatment. The same was observed for the positive control treatment. For the negative control treatment, the median number of micronucleated erythrocytes stayed the same. These results allow us to suggest that drugs at this concentration produce non-repairable damage and cause the consequent elimination of very damaged cells.

In the bone marrow, the results were similar. There was a reduction in MNPCE frequency 48 hours after treatment, which can be explained by the destruction of very damaged erythrocytes or by a reduction in the drug concentration in bone marrow, with a consequent reduction in the induction of genetic damage. We observed the opposite phenomenon for the positive control, that is, a discreet MNPCE increase 48 hours after treatment, which can be explained by the longer half-life of doxorubicin in the organisms compared to sibutramine and fenproporex. Aleisa et al.¹⁹ also observed the same for the 5.0 mg/kg bw doxorubicin and the opposite for 15 mg/kg bw doxorubicin.¹⁹

The continuous production of MNPCE and MNNCE depends on the persistence of the agent, on DNA lesions, on formation and loss, on chromosomal aberrations and on the rate of recovery of the cellular cycle. Upon interruption of drug action, the frequency of MNPCE will return to the previous rate. In additional studies comparing the frequency of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood and bone marrow with chronic exposition it was found that micronucleated erythrocytes accumulated in

peripheral blood independently of the interference of the spleen. However, the frequency in the peripheral blood was equal or larger than that in the bone marrow. The spleens of several species remove micronucleated erythrocytes from the circulation. Despite some disagreement, mice, horses and felines are considered tolerant to the presence of micronucleated erythrocytes in the sanguine circulation.⁵⁹

In the micronucleus test in the bone marrow for the 24-hour time period, we observed that sibutramine and fenproporex increased clastogenic and/or aneugenic damage in a dose-dependent manner. Krishna and Hayashi¹⁴ affirm that one criterion for a positive result can be an increase in MNPCE related to an increase in dose. Suter, Martus and Elhajouji⁶⁰ consider a positive treatment to be one in which the agent provokes an increase of 20% in frequency of MNPCE in relation to the negative control.

We found that in the bone marrow, the frequencies of MNPCE were smaller than those of MNNCE in the peripheral blood, except for the positive control. Udriou⁵⁹ also observed this result. A possible explanation for the behavior of the positive control is that cells that are severely damaged by genotoxic and/or cytotoxic agents die. The possible reason why fenproporex at the different concentrations maintained approximately the same number of MNNCE in the peripheral blood is that, at higher concentrations, the drug destroyed MNNCE, while sibutramine had a less severe effect, allowing us to detect a dose-response relationship.

The alkaline version of the comet assay is very sensitive in detecting damage (DNA breaks and alkali labile site) and DNA repair. As DNA damage or failure in repair produces mutations and mutations are important for the development of carcinogenesis, this information is very useful in programs of risk evaluation, even though there is no evidence that a high level of damage in white blood cells increases the cancer risk.^{30,61-63} The comet assay detects DNA primary damage, which is often repairable, while the micronucleus test detects fixed lesions in chromosomes or aneugenic effects.⁶⁴ In analyzing the results of the comet assay for sibutramine and fenproporex (40 mg/kg bw, 3, 24 and 48 hours after treatment), we did not find differences in the damage scores over periods of 3 and 24 hours, which suggests that there was no damage repair for the drugs at this concentration. With the 48-hour period, there were reductions in the damage scores for both drugs, which can be explained by decreases in drug concentrations in

peripheral blood, and as a consequence, decreases in the source of damage, as well as by the elimination of very damaged cells.

In the results for treatments of 24 hours, sibutramine displayed a positive relationship between the dose and the damage scores for 10 and 20 mg. For a concentration of 40 mg, there was a reduction in the damage score that may be due to the elimination of very damaged cells, that is, at this concentration the drug produces more damage, causing the death of some cells. A similar behavior occurred with fenproporex, where we observed a positive relationship between the dose and the damage scores for 10 and 20 mg, but between concentrations of 20 and 40 mg, there is no difference in damage scores, this may be due to the elimination of very damaged cells in concentration of 40 mg.

If we consider the Human Equivalent Dose (HED), in our study we worked with doses 1.5 to 6.5 and 1.2 to 4.85 times the highest dose prescribed for humans, respectively, for sibutramine and fenproporex.⁶⁵ Therefore, with the conditions and methods used in this study, sibutramine and fenproporex increased the frequency of genetic damage in hematopoietic cells of Swiss mice in relation to the negative control. We also observed that these drugs are not cytotoxic for the PCE of the bone marrow of Swiss mice. Due to the high consumption of these drugs around the world and their importance for public health, we recommend continued studies in order to determine the mechanism of production of the genetic damage and also recommend the use of antioxidants (free radicals scavengers) in therapies with these drugs.

Acknowledgements

The authors are grateful to Luiz Augusto da Costa Junior and Sueli Aparecida Neves and Rubens Salomão de Campos for their technical assistance. This work was sponsored by CNPq, CAPES, FAEPA, HCFMRP, SEEGO and FMRP.

Declaration of conflicting interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- World Health Organization (WHO). Obesity and overweight 2006. Media Centre, Fact Sheet N° 311.
- Friedman, JM. Obesity in the new millennium. *Nature* 2000; 404: 632–634.
- Oster G, et al. Lifetime health and economic benefits of weight loss among obese persons. *Am J Public Health* 1999; 89: 1536–1542.
- Halford JCG. Pharmacotherapy for obesity. *Appetite* 2006; 46: 6–10.
- Deitel M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obesity Surg* 2003; 13: 329–330.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares 2002–2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. IBGE – Rio de Janeiro 2004; 1–76.
- Behar R. Anorexígenos: indicaciones e interacciones. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria* 2002; 40: 21–36.
- Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes (JIFE). Informe de la junta internacional de estupefacientes correspondiente a 2006. Nações Unidas – Nueva York, 2007.
- Almeida AE, Ribeiro ML, Polese L. Determination of anfepramone hydrochloride, fenproporex, and diazepam in so-called “natural” capsules used in the treatment of obesity. *J Liquid Chromat Related Technol* 2000; 23: 1109–1118.
- Azeredo FS, Guimarães RI, Paula JR, Cunha LC. Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. *Infarma* 2005; 17: 86–88.
- Carlini EA, et al. II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país - 2005. São Paulo: Páginas & Letras, 2007, p.1–472.
- Snyder RD, Green JW. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutat Res* 2001; 488: 151–169.
- Engelhardt G. In vivo micronucleus test in mice with 1-phenylethanol. *Arch Toxicol* 2006; 80: 868–872.
- Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 2000; 455: 155–166.
- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; 455: 81–95.
- Luque CA, Rey JA. The discovery and status of sibutramine as an anti-obesity drug. *Eur J Pharmacol* 2002; 440: 119–128.
- Gunter MJ, Leitzmann MF. Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 145–156.
- Vijayalaxmi, Kligman AD, Prihoda TJ, Ullrich SE. Micronucleus studies in the peripheral blood and bone marrow of mice treated with jet fuels, JP-8 and Jet-A. *Mutat Res* 2006; 608: 82–87.
- Aleisa AM, et al. Effect of metformin on clastogenic and biochemical changes induced by adriamycin in Swiss albino mice. *Mutat Res* 2007; 634: 93–100.

[3]

[5]

20. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 727–741.
21. Resende FA, et al. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutat Res* 2007; 634: 112–118. 6
22. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), OECD guidelines for the testing of chemicals: mammalian erythrocyte micronucleus test 1997; Section 4, Guideline 474.
23. Guzmán A, et al. Evaluation of the genotoxic potential of the natural neurotoxin tetrodotoxin (TTX) in a battery of in vitro and in vivo genotoxicity assays. *Mutat Res* 2007; 634: 14–24. 7
24. Stich HF, Curtis JR, Parida BB. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int J Cancer* 1982; 30: 553–559.
25. Konopacka M. Evaluation of frequency of micronuclei in exfoliated cells from bladder of mice treated with benzo(a)pyrene, 2-acetylaminofluorene and cyclophosphamide. *Cell Biol Int* 1994; 18: 669–672.
26. Ballarín C, et al. Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. *Mutat Res* 1992; 280: 1–7. 8
27. Mello MLS. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Braz J Genet* 1997; 20: 257–264.
28. Hartmann A, Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett* 1997; 90: 183–188.
29. Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 1995; 336: 69–77.
30. Collins AR, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008; 23: 143–151. 9
31. Tice RR, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 206–21. 10
32. Tice RR, et al. Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the p53 gene. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31: 113–124. 11
33. Abolfathi Z, et al. A pilot study to evaluate the pharmacokinetics of sibutramine in healthy subjects under fasting and fed conditions. *J Pharmacol Sci* 2004; 7: 345–349. 12
34. Product Information: Meridia(R), sibutramine hydrochloride monohydrate. Knoll Pharmaceutical Company, 1999, Mount Olive, NJ.
35. Ramzi F, Elias D, Mona S, Zreik TG. Sibutramine in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol* 2005; 122: 243–244.
36. Physicians Desk Reference (PDR). 58th ed. Montvale, NJ: Thompson, 2004, p.491–496.
37. De Santis M, et al. Early first-trimester sibutramine exposure: pregnancy outcome and neonatal follow-up. *Drug Safety* 2006; 29: 255–259. 13
38. Ara R, Brennan A. The cost-effectiveness of sibutramine in non-diabetic obese patients: evidence from four western countries. *Obesity Rev* 2007; 8: 363–371.
39. Kiortsis DN, et al. Effects of sibutramine and orlistat on mood in obese and overweight subjects: a randomised study. *Nutr, Metabol Cardiovasc Dis* 2008; 18: 207–210. 14
40. Hainer V, et al. Serotonin and norepinephrine reuptake inhibition and eating behavior. *Ann New York Acad Sci* 2006; 1083: 252–269. 15
41. Halpern A, Mancini BW. Diabesity: are weight loss medications effective. *Treat Endocrinol* 2005; 4: 65–74.
42. Moreira CQ, Faria MJ, Moreira EG. Behavioral neurotoxicity in adolescent and adult mice exposed to fenproporex during pregnancy. *Human Exper Toxicol* 2005; 24: 403–408.
43. Cody JT, Valtier S, Stillman S. Amphetamine and fenproporex levels following multidose administration of fenproporex. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 187–94.
44. Kraemer T, et al. Fenproporex N-dealkylation to amphetamine-enantioselective in vitro studies in human liver microsomes as well as enantioselective in vivo studies in Wistar and dark Agouti rats. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 947–957. 16
45. Sweetman SC. *Martindale: the complete drug reference*. 34th ed. London: Pharmaceutical Press, 2005, p.1588–1589.
46. Kowallowski AJ. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 241–250.
47. Brand MD, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biol Med* 2004; 37: 755–767. 17
48. Serviddio G, et al. Bioenergetics in aging: mitochondrial proton leak in aging rat liver, kidney and heart. *Redox Report* 2007; 12: 91–95. 18
49. Burcham PC. Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat Res* 1999; 443: 11–36.
50. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 2000; 404: 652–660.

- 19 51. Souza SC, et al. Perilipin regulates the thermogenic actions of norepinephrine in brown adipose tissue. *J Lipid Res* 2007; 48: 1273–1279.
- 20 52. Fisher MH, et al. A selective human β_3 adrenergic receptor agonist increases metabolic rate in Rhesus monkeys. *J Clin Invest* 1998; 101: 2387–239.
53. Diehl AM, Hoek JB. Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control “the benefits of losing control”. *J Bioenerg Biomemb* 1999; 31: 493–506.
54. Nagy TR, Blaylock ML, Garvey WT. Role of UCP2 and UCP3 in nutrition and obesity. *Nutrition* 2004; 20: 139–144.
55. Adler ID. Cytogenetic tests in mammals. In: Venitt S, Parry JM (ed.) *Mutagenicity testing*. Oxford: IRL Press, 1984, p.275–306.
56. Gollapudi BB, McFadden LG. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutat Res* 1995; 347: 97–99.
- 21 57. Mavroumin KH, et al. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. *Mutat Res* 1990; 239: 29–80.
58. Harmonized Tripartite Guideline S2(R1). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) 2008. Genève, Switzerland, 1–26.
59. Udroui I. Feasibility of conducting the micronucleus test in circulating erythrocytes from different mammalian species: an anatomical perspective. *Environ Mol Mutagen* 2006; 47: 643–646.
60. Suter W, Martus H-J, Elhajouji A. Methylphenidate is not clastogenic in cultured human lymphocytes and in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Mutat Res* 2006; 607: 153–159.
61. Wasson GR, McKelvey-Martin VJ, Downes CS. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis* 2008; 23: 153–162.
62. McKenna DJ, McKeown SR, McKelvey-Martin VJ. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* 2008; 23: 183–190.
63. Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 2008; 23: 191–205.
64. Hartmann A, et al. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chemical Toxicol* 2001; 39: 843–858.
- 22 65. Shaw-Reagan S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2007; 22: 659–661.

Anexo C: Cuba de Eletroforese

CUBA OPACA PARA LISAR, NEUTRALIZAR E CORRER ELETROFORESE EM LÂMINAS COM AGAROSE, NA VERTICAL , DESTINADAS À REALIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA

1. INTRODUÇÃO

O registro de um medicamento requer estudos refinados que avaliem seu potencial genotóxico, Devido à correlação positiva entre potencial genotóxico e carcinogenicidade. Como há muitas divergências nos resultados dos diferentes testes as organizações fiscalizadoras visando amenizar os erros, recomendam a realização de uma bateria de teste para avaliar o potencial de risco de uma substância, pois nenhum teste genotóxico isolado é capaz de detectar todos os mecanismos genotóxicos relevantes na tumorigênese.

Uma bateria de teste padrão possui seguinte característica:

- c) avaliação de mutagenicidade através de teste de mutação reversa em bactéria
- d) avaliação da genotoxicidade em células de mamíferos *in vitro* e/ou *in vivo* (ICH, 2008).

O Ensaio Cometa ou single-cell gel electrophoresis assay (SCGE) é amplamente aceito por agências fiscalizadoras/regulamentadoras em todo o mundo. É um dos métodos toxicológicos mais promissor, pois permite a detecção de danos no DNA em uma população de células eucarióticas obtidas de uma simples suspensão celular. Este ensaio é usado para diferentes tipos de estudo incluindo: reparos de danos no DNA, biomonitoramento humano e toxicologia genética (Fracasso *et al.*, 2004; Hoffmann, et al., 2005). De forma que o Ensaio cometa pode ser aplicado em testes genotóxicos tradicionais *in vivo* e *in vitro* em ecotoxicologia, toxicologia aquática, investigação em indústria química, farmacêutica, de biocidas, agroquímicas, química de alimentos bem como seus aditivos. Ele também é usado como biomarcador em câncer e estudos nutricionais (Lovell e Omori1, 2008)

Além disso, muitos estudos têm demonstrado com sucesso que o Ensaio Cometa pode ser aplicado para análise de células derivadas de vários tecidos diferentes indicando que este ensaio poderá ser importante em muitas áreas de investigação clínica por permitir obter informações importantes sobre as características intrínsecas do DNA de células individuais e sua resposta a vários fatores externos como radiação, substâncias químicas e drogas. Estas informações poderão ser relevantes no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer. Do ponto de vista prático o Ensaio Cometa poderá ser satisfatoriamente utilizado na rotina clínica por ser uma técnica

relativamente simples, barata, requer poucas células para análise, e o resultado pode ser obtido dentro de algumas horas (Collins *et al.*, 2008; McKenna *et al.*, 2008).

O Ensaio Cometa além de ser um método rápido, sensível e barato para avaliar quebras na fita de DNA em células eucariótica e para a investigação de danos genéticos associados a exposição a um potencial agente genotóxico o ensaio também ainda tem a vantagem que pode ser feito com células que não estão em proliferação e as células de um determinado tecido pode ser avaliadas em grande número. Outra vantagem é que desde que o método foi descrito por Östling e Johanson (1984), há mais de 20 anos, ele vem passando por refinamentos. Diretriz elaboradas pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) estabelece a metodologia para realização do Ensaio Cometa na versão alcalina (pH 13) *in vivo*, para determinar genotoxicidade e a validação do Ensaio Cometa *in vivo* é planejada pelo Mammalian Mutagenesis Study Group (MMS)/Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JCVAM). Os métodos *in vitro* também estão sendo desenvolvidos visando futura validação (Lovell e Omori, 2008).

O “cometa” é formado quando nucleóides são expostos em condições alcalinas ou neutras a um campo eletroforético. Caso haja quebra na fita de DNA a estrutura compacta relaxará e alças da fita de DNA rompida se estenderá formando halos semelhante a cauda de um cometa. As alças rompidas migram em direção ao ânodo (pólo positivo), e a extensão e densidade da cauda está diretamente relacionada com o nível de danos.

Os resultados do Ensaio cometa variam consideravelmente nas publicações científicas. Uma das causas desta variação é a falta de protocolo padrão para a realização de eletroforese. Os protocolos que são descritos frequentemente são insuficientes. Normalmente afirmam que a eletroforese é realizada em uma voltagem fixa de 25 V e uma corrente de 300mA que é alcançada ajustando o volume da solução de eletroforese. Na maioria das cubas de eletroforese fica apenas uma camada de poucos milímetros de solução sobre a plataforma onde as lâminas são posicionadas para a eletroforese. A maioria da voltagem aplicada pode atravessar esta área devido a sua alta resistência ôhmica. Uma pequena variação no volume de solução ao longo da superfície pode ter significativo efeito na voltagem juntamente com a temperatura e pH. Deve ser enfatizado que o total de voltagem e corrente aplicados em teoria são irrelevantes, desde que esta voltagem atravesse o gel (V/cm na plataforma) que é a força motriz para eletroforese de moléculas de DNA carregadas. Uma alta corrente poderia ser preferível, só que adicionando mais

solução de eletroforese levará a diminuição da V/cm na plataforma a menos que o total de voltagem aplicada seja similarmente aumentada. Deve ser notado que no protocolo original de Singh et al. (1988), uma camada de solução fina sobre o gel é especificada junto com a voltagem total de 25V, não há menção de uma corrente particular ; o hábito de trabalhar com 300mA deve possivelmente ao fato que fonte com potencial maior são mais caras. Na descrição de eletroforese para publicação o único parâmetro relevante que deve ser especificado é a V/cm através da plataforma (Collins et al.,2008).

Este estudo tem objetivo de colaborar com o aperfeiçoamento da técnica produzindo um equipamento de eletroforese específico para a realização do Ensaio Cometa.

2. OBJETIVOS

Produzir um equipamento refratário a luz;

Produzir um equipamento, portátil compacto e com boa capacidade (30 lâminas);

Produzir um equipamento que otimiza a manipulação das lâminas; (lise, eletroforese e neutralização é feita no mesmo recipiente);

Produzir um equipamento que trabalha com baixas quantidades de soluções;

Produzir um equipamento de baixo custo;

Produzir um equipamento de eletroforese que dispensa as fontes convencionais.

3. DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO

Material: Acrílico preto, fio cirúrgico N°1, fêmea para plugs banana, cola para acrílico, fios com plugs banana, fonte de energia com voltagem constante

Medidas:

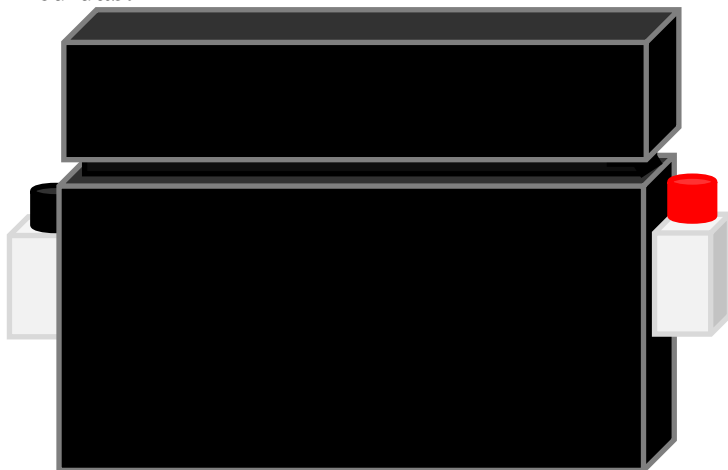


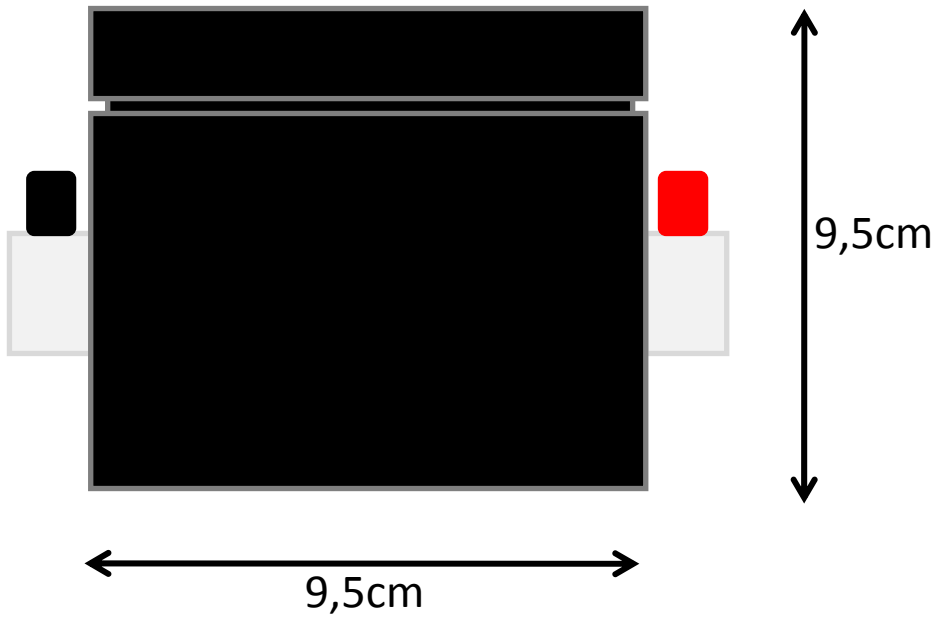
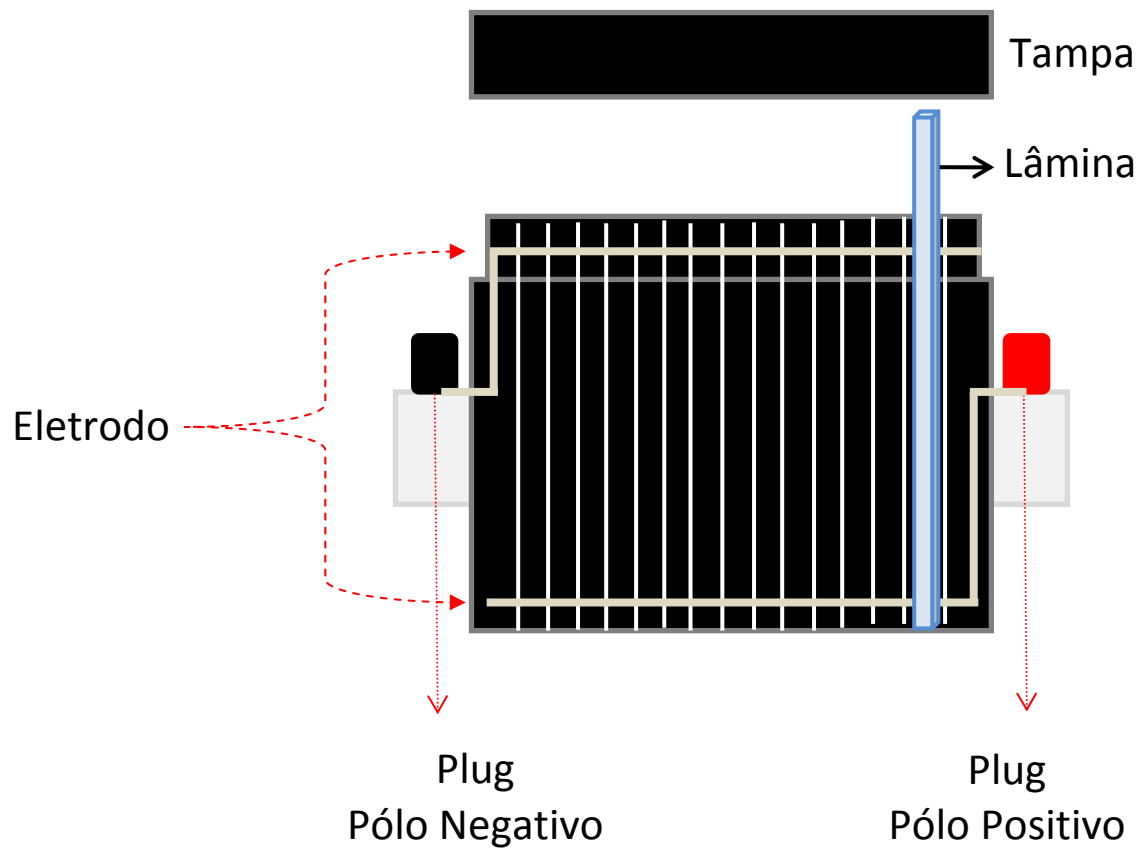
Figura 1. Esquema externo da cuba**Figura 2.** Medidas da cuba em centímetros.

Fig.3. Corte frontal

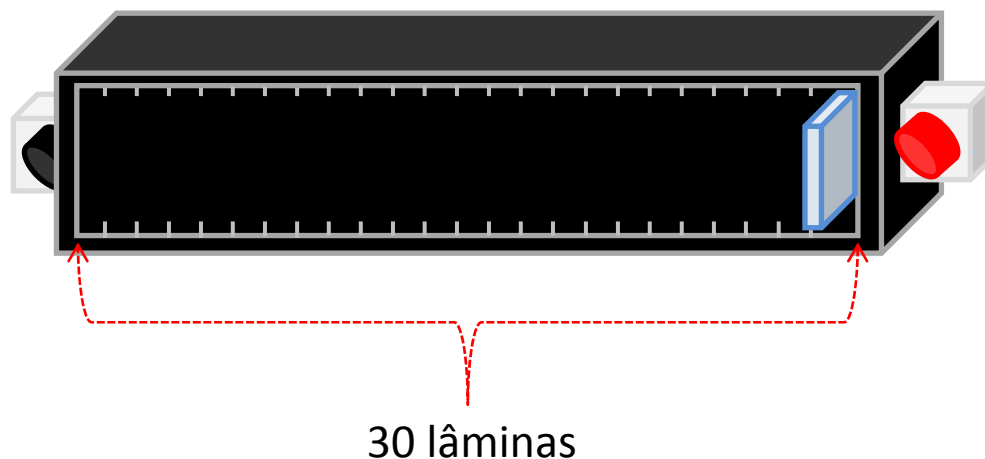
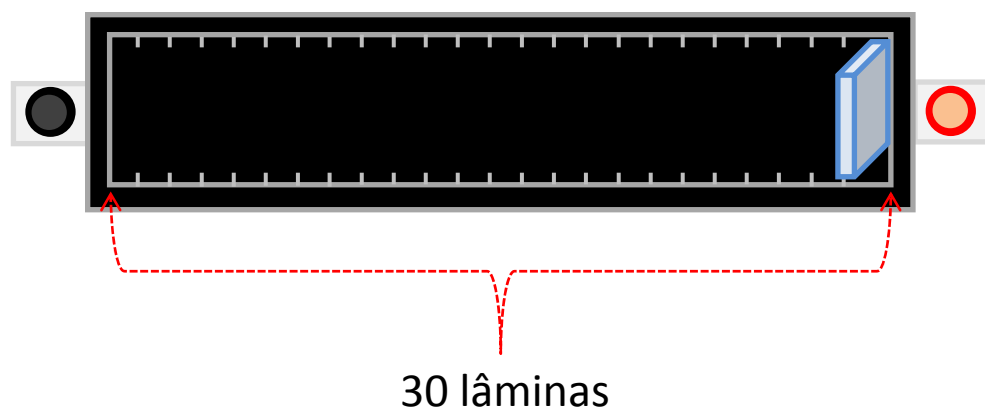
**Figura 4.** Estrutura interna

Figura. 5. Estrutura interna

A parte interna possui endentações de encaixe com 2mm cada, que permite colocar 30 lâminas de vidro de 76 x 26mm na posição vertical impedindo o contato entre elas (Fig. 3, 4 e 5).

No interior da cuba a 10mm da borda encontra-se o eletrodo de fio cirúrgico disposto na horizontal. Este eletrodo é ligado ao pólo negativo (Fig.3).

Ainda no interior da cuba na região inferior encontra-se o eletrodo que ligará ao pólo positivo (Fig.3).

Na porção inferior da lateral esquerda encontra-se a torneira para drenagem das soluções.

4. DADOS TÉCNICOS DE FUNCIONAMENTO

Amperagem: 243-247 mA

Voltagem: 5 v

Tempo de corrida: 20 minutos

5. VANTAGENS DO EQUIPAMENTO EM TESTE COM RELAÇÃO AO CONVENCIONAL

- Baixo custo e simplicidade para construção;
- Economia no consumo de soluções:

Soluções	Cuba Convencional (24 lâminas)	Cuba Experimental (30 lâminas)
Lise	100mL	100mL
Eletroforese	±1,8mL	100mL
Neutralização	±200mL	100mL

- Portátil e compacto;
Equipamento convencional:
Cuba: 25cm x 8 x 25cm
Fonte: 14cm x 8cm x 10cm
Massa Total: ± 4 kg
Equipamento Experimental:
Cuba: 9,5cm x 9,5cm x 3,7cm
Fonte: 6,5cm x 4,5cm x 4cm
Massa total: 800g
- Reduz o tempo de manipulação;
- Dispensa o uso de anteparo (papel alumínio) para proteger da luz;

6. DESVANTAGENS

Até onde foi conduzido nosso experimento não detectamos desvantagens.

7. EXPERIMENTOS COMPARATIVOS

7.1 Substâncias genotóxica

Usamos doxorubicina, cloridrato de epirrubicina e etoposido, três agentes genotóxicos bem conhecidos, para realizar este estudo.

7.2 Linhagem celular e tratamentos

Usamos a linhagem de células V79 (fibroblasto de hamster). O meio de cultura empregado no experimento foi HAM-F10 +D-MEN, na proporção 1:1, enriquecido com 10% de soro bovino fetal.

A doxorrubicina foi testada nas concentrações de 0,15 µg, 0,30 µg e 0,75 µg/mL de meio de Cultura, o etoposido 0,15µg e 0,30 µg/mL de meio e o cloridrato de epirrubicina a 0,03 µg/mL . Como controle negativo usamos o próprio meio de cultura. As células são expostas por duas horas aos agentes genotóxicos, decorrido este período procede-se a realização do Ensaio Cometa.

7.3 Ensaio Cometa

O “Single-Cell Electrophoresis Assay” ou Ensaio Cometa foi realizado sob condições alcalinas. Inicialmente 15 µl de cada amostra de células em cultura são generosamente misturadas com 160 µl de agarose “low-melting-point” na concentração de 0,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37°C e aplicada em camada homogênea, com o auxílio de lamínulas(24 x 60mm) sobre uma lâmina de vidro (26 x 76mm), preparada anteriormente com uma fina camada de agarose normal-melting-point na concentração de 1.5 % (Invitrogen). Todo estes procedimento são feitos ao abrigo da luz e colocados por um intervalo de 4-8 minutos em refrigerador a 4°C e decorrido este período as lamínulas são retiradas cuidadosamente e as lâminas são transferidas para cubas de coplin contenda solução de lise (1% Triton X-100, 2.5 mM NaCl, 0.1 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris with 10% dimethylsulfoxide, pH 10.0) a 4°C recém preparada aí permanecendo por no mínimo 12 horas. Após este período as lâminas são dispostas ordenadamente em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução de eletroforese a 4°C (0.3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH >13) permanecendo imersas por 20 minutos. Usando a mesma solução é feita a “corrida” da eletroforese usando tensão elétrica constante de 25V, e corrente de 300mA na cuba convencional e 5V e corrente de 247mA na cuba teste; o tempo de corrida foi de 20 minutos. Após a eletroforese as lâminas são imersas por 15 minutos em solução de neutralização (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) decorrido este período as lâminas são fixadas por 5 minutos em etanol 100% , e deixadas para secar na temperatura ambiente, depois de secas são apropriadamente estocada em containeres e deixadas na temperatura ambiente até o momento da coloração. Posteriormente as lâminas são coradas com prata seguindo a seguintes etapas:

primeiros às lâminas são imersas por 10 minutos em solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5%, glicerol 15%) após são lavadas com água destilada e deixadas secar a temperatura ambiente. Depois de secas são imersas em água destilada e reidratadas por 5 minutos; em seguida são colocadas na solução de coloração preparada minutos antes que resulta da mistura da solução A (carbonato de sódio 5%) com a solução B (nitrito de amônia 0,1%, nitrito de prata 0,1%, ácido tungstosilícico 0,25% e formaldeído 0,15%). Protegidas da luz são colocadas em shaker por 30 minutos a temperatura ambiente; decorrido este período as lâminas são lavadas com água destilada e imersas em solução stop (ácido acético 1%) por 5 minutos para paralisar a coloração dando seqüência as lâminas são lavadas novamente com água destilada e deixadas secar a temperatura ambiente a partir de então estão prontas para análise microscópica. As lâminas são examinadas com objetiva 40X em microscópio óptico de luz. As lâminas codificadas são avaliadas em “teste cego” e são analisadas 100 nucleóides por tratamento (100 nucleóides por lâmina e três lâminas por tratamento). Os nucleóides são classificados de acordo com o tamanho da cauda visualizada em 5 classes, sendo os não danificados pertencentes a classe zero(0) e os nucleóides totalmente danificados a classe quatro(4). O valor (índice de dano) é atribuído para cada nucleóide analisado de acordo com sua classe. O índice de dano varia de zero(0) quando todos os nucleóides não apresentam danos (100 nucleóides X 0) a quatrocentos quando todos os nucleóides apresentam nível máximo de danos (100 nucleóides X 4). Nucleóides com alterações atípicas são desconsiderados na contagem pois os mesmos podem ser oriundos de células mortas (Hartmann e Speit, 1997; Tice et al. 2000.)

8. Resultado do Ensaio Cometa Comparando a Cuba Experimental com a Cuba Convencional

Tratamentos	Cuba Experimental (média do score de danos)	Cuba Convencional (média do score de danos)	Valor de P (test-T Student)
Doxorrubicina 0,15 µg/mL	86,3 ± 18,1	102 ± 24,3	0,4212
Doxorrubicina 0,30 µg/mL	105,6 ± 26,3	91,7 ± 24,6	0,5191
Doxorrubicina 0,75 µg/mL	111,7 ± 35,2	105,3 ± 16,5	0,7919
Etoposido 0,15 µg/mL	99,3 ± 17,2	114,3 ± 42,8	0,6109
Etoposido 0,30 µg/mL	173,3 ± 30,6	188,7 ± 35,5	0,6529
Epirrubicina 0,30 µg/mL*	207 ± 10,3	188,2 ± 10,9	0,0230
Controle Negativo	28,3 ± 3	25,3 ± 10,21	0,6529

*na cuba experimental a corrente foi de 300mA e a tensão foi 4V foram avaliados 500 nucleóides.

Avaliando os valores obtidos foi possível observar que não há diferenças nas médias de escores de danos no DNA, entre a cuba experimental e a convencional para as concentrações e

agentes testados, exceto para cloridrato de epirrubicina 0,30 µg/mL (cuba experimental com corrente constante de 300mA e tensão de 4V) que a média de escore de danos na cuba experimental foi significativamente, em termos estatísticos, superior ao da cuba convencional.

9. CONCLUSÕES

De posse destes dados podemos concluir que a cuba experimental apresenta a mesma eficácia na detecção de danos no DNA de célula V79 que a cuba convencional, de modo que sugerimos a continuidade dos testes para introduzi-la na rotina laboratorial.

BIBLIOGRAFIA

ICH, (2008). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Harmonised Tripartite Guideline Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use S2(R1).

Lovell, DP, Omori, T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* vol. 23 no. 3 pp. 171–182, 2008.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35(3), 206-221.

Hartmann, A., Speit, G., 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters*. 90(2-3), 183-188.

Fracasso, ME, Franceschetti, P, Doria, D, Talamini, G, Bonetti, F. DNA breaks as measured by the alkaline comet assay in exfoliated cells as compared to voided urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: a study of 105 subjects, *Mutat. Res.* 564 (2004), pp. 57–64.

Hoffmann, H, Högel, J, Speit, G. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2005 20(6):455-466.

McKenna, D J, McKeown, S R, McKelvey-Martin, VJ. Potential use of the comet assay in the clinical management of câncer. *Mutagenesis* vol. 23 no. 3 pp. 183–190, 2008.

Collins, A R, Oscoz, A A, Brunborg, G, Gaivão, I, Giovannelli, L, Kruszewski, M, Smith, C C, Stetina, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* vol. 23 no. 3 pp. 143–151, 2008.

Ostling, O, Johanson, K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 123, Issue 1, 30 August 1984, Pages 291-298.

Singh, N P, McCoy, M T, Tice, RR, Schneider, E L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191 (1988)

Anexo D: Aprovação da Pesquisa com Material Humano




Ribeirão Preto, 30 de agosto de 2006

Ofício nº 2445/2006
CEP/MGV

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DOS FITOTERÁPICOS *Echinodorus grandiflorus* Mitch. E *Cordia ecalyculata* Vell. E DOS FÁRMACOS FEMPROPOREX E SIBUTRAMINA PRESCRITOS EM PROGRAMAS DE REDUÇÃO DE MASSA CORPORAL”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 232ª Reunião Ordinária realizada em 28/08/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4684/2006.

Atenciosamente.


DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Secretária do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
CRISTIANO JOSÉ DA SILVA
PROF^a DR^a CATARINA SATIE TAKAHASHI (Orientadora)
Depto. de Genética – Laboratório de Citogenética e Mutagênese

Anexo E: Aprovação da Pesquisa com Camundongos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 032/2006, sobre o projeto intitulado, “*Avaliação da atividade citotóxica, mutagênica e antimutagênica dos fitoterápicos Echinodorus grandiflorus Mitch. e Cordia ecalyculata Vell. e dos fármacos femproporex e sibutramina prescritos em programas de redução de massa corporal*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Catarina Satie Takahashi**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de *26 de junho de 2006*.

(We certify that the protocol n° 032/2006, about “*Evaluation of the Cytotoxic, Mutagenic and Antimutagenic Activity of the Phytotherapeutic Echinodorus granfiflorus Mütch and Cordia ecalyculata Vell and of the drugs Fenproporex and Sibutramina Prescribe in Weigth-Loss Programs*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in *06/26/2006* meeting).

Ribeirão Preto, 28 de junho de 2006

Prof. Dr. JOÃO SANTANA DA SILVA
Decano da Comissão de Ética
em Experimentação Animal

Anexo F: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
LABORATÓRIO DE CITOGÊNETICA E MUTAGÊNESE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (a) Sr. (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa sob a responsabilidade do pesquisador: Cristiano José da Silva.

Telefone do Pesquisador: Laboratório 16 36023082 ou 16 91487519

Título da pesquisa

Avaliação da Atividade Citotóxica, Mutagênica e Antimutagênica dos fitoterápicos *Echinodorus grandiflorus* Mitch. e *Cordia ecalyculata* Vell. e dos Fármacos femproporex e sibutramina Prescritos em Programas de Redução de Massa Corporal;

Por que esta sendo feito a pesquisa?

Este trabalho procura entender porque há elevado índice de câncer na população com sobrepeso ou obesa;

Objetivo da pesquisa

Verificar se alguns dos medicamentos (remédios) e fitoterápicos (Chapéu-de-couro e Porangaba) usados em tratamento de obesidade (para emagrecer) causam danos no material genético (DNA) de células do sangue de seres humanos.

Por que o (a) Sr. (a) é importante nesta pesquisa

Você apresenta as condições requeridas (desejáveis) que estão previstas para o desenvolvimento da pesquisa dentre as quais, a mais importante é o sobrepeso ou obesidade, e no caso de controle massa corporal (peso) considerado normal;

O que tem que fazer para participar da pesquisa

Permitir que um profissional devidamente habilitado colete (tire) 20ml de seu sangue venoso (nas veias);

Qual o desconforto que terá ao participar da pesquisa

O desconforto é apenas o causado na hora de colher o sangue (tirar) ocorre uma leve dor ao introduzir a agulha em sua veia;

Você terá algum risco se participar da pesquisa

O único procedimento ao qual será exposto é a colheita dos 20ml de sangue. O material utilizado para tirar seu sangue (seringa, agulha e luvas) é novo e limpo (estéril). É usado uma única vez e depois jogado (descartado) em lixo especial, em alguns casos poderá haver extravasamento de sangue e formação de hematoma (no local onde introduziu a agulha fica roxo e inxado);

O que será feito com o seu sangue

Será enviado para o laboratório (onde faz os exames) e realizará alguns testes usando as células sanguíneas. Após a realização dos testes as células recebem tratamentos especiais (esterilização) e são descartadas;

O que acontecerá se o (a) Sr. (a) não quiser participar desta pesquisa

Nada! Sua participação é livre (somente se você estiver de acordo);

Quais os benefícios desta pesquisa

De imediato nenhum benefício. Após a realização dos testes, e se verificar algum efeito danoso (mal) provocado por algum dos medicamentos ou fitoterápicos, ao material genético das células, a pesquisa servirá de alerta e permitirá que as pessoas tenham conhecimento que estas substâncias poderão lhes fazer mal.

Biomédico: Cristiano José da Silva

Pesquisador Responsável
RG: 3008 643 – SSPGO

Eu.....portador (a) do RG
Nº.....abaixo assinado, tendo recebido as informações sobre a
pesquisa que será realizada e ciente de meus direitos relacionados abaixo, concordo em
participar desta pesquisa, doando 20ml de sangue.

Direito do participante doador de sangue:

1. Garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionado com a pesquisa a que participarei doando 20ml de sangue;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo em relação ao meu tratamento;
3. A segurança que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informações atualizadas durante o estudo ainda que possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e indenização que legalmente teria direito por parte da instituição à saúde, em casos de danos que justifiquem, diretamente causada pela pesquisa;
6. Que se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

TENHO CIÊNCIA DO EXPOSTO ACIMA

Assinatura do Participante

Ribeirão Preto,.....de.....de 2009

ANEXO G: Pedido de Patente



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OFÍCIO 003/2010

Ribeirão Preto, 08 de janeiro de 2010.

REF.: "PEDIDO DE PATENTE"

Senhor Diretor:

Solicito a V. Sa., encaminhar ao Magnífico Reitor, a solicitação de depósito do pedido de patente sob título: "CUBA OPACA PARA LISAR, NEUTRALIZAR E CORRER ELETROFORESE EM LÂMINAS COM AGAROSE, NA VERTICAL, DESTINADAS À REALIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA".

Informo para os devidos fins que a pesquisa foi desenvolvida:

Somente com meios e recursos da USP.

Os inventores do pedido de patente são:

Prof. Dr. Catarina Satie Takahashi (Orientadora)

Sr. Pós-Graduando: Cristiano José da Silva (Inventor)

OBS.: O esboço do relatório descritivo será encaminhado diretamente à Agência USP de Inovação, para manter o sigilo do invento.

Os dados completos dos inventores estão descritos no ANEXO II.

Agradecendo a atenção, subscrevo-me.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Catarina Satie Takahashi

Ciente, encaminhe-se ao Diretor(a).

Prof. Dr. Arnaldo Luiz Simões
Chefe do Depto. Genética-FMRP-USP

Ílmo. Sr.
Prof. Dr. Benedito Carlos Maciel
D.D. Diretor da FMRP-USP

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](#)