



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

TATIANE DA SILVA PASSOS

**EFEITOS QUIMIOPROTETIVOS DO FLAVONOIDE
HESPERIDINA CONTRA MUTAGENICIDADE
INDUZIDA POR CISPLATINA EM MEDULA ÓSSEA
DE CAMUNDONGOS**

VITÓRIA

2013

TATIANE DA SILVA PASSOS

**EFEITOS QUIMIOPROTETIVOS DO FLAVONOIDE
HESPERIDINA CONTRA MUTAGENICIDADE
INDUZIDA POR CISPLATINA EM MEDULA ÓSSEA
DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci.

VITÓRIA

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

"Efeitos Quimioprotetivos do Flavonóide Hesperidina contra Mutagenicidade
Induzida por Cisplatina em Medula Óssea de Camundongos"

Tatiane da Silva Passos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:

Prof.ª. Dr.ª. Maria do Carmo Pimentel Batitucci (UFES)
Orientadora

Prof.ª. Dr.ª. Flavia de Paula (UFES)
Membro Interno

Prof.ª. Dr.ª. Silvia Tamie Matsumoto (PPGBV/UFES)
Membro Externo

Vitória-ES, 25 de março de 2013.

A **Deus** seja dada toda a honra.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** por ter me concedido saúde para chegar até aqui, sem Ele nada disso seria possível.

À minha orientadora **Profª Drª Maria do Carmo Pimentel Batitucci**, pela dedicação ao ensino e a pesquisa, pela orientação e amizade. Muito obrigada por abrir as portas do laboratório e permitir a realização deste trabalho.

Às professoras **Silvia Tamie Matsumoto** e **Maria Aparecida Marin-Morales** por aceitarem a participar da banca.

Aos maravilhosos colegas do laboratório de Genética Vegetal e Toxicologia, por toda ajuda, amizade e momentos de descontração: **Isabel, Jean, Josy, Juliana, Luciano, Patricia e Urraca**.

À turma de 2011 de mestrado da **PPGBiotec**, em especial ao presentinho que o mestrado me trouxe e que deixou as aulas e os trabalhos muito mais divertidos, minha amiga Gabi.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, incluindo os professores e funcionários.

Ao meu querido esposo, **Kleber**, por me amar, me apoiar e me acompanhar com toda “disposição” do mundo todas às vezes (que não foram poucas) que precisei vir ao laboratório no fim de semana.

Aos meus pais **Wilton** e **Eunice** que desde graduação não pouparam esforços para investir nos meus estudos e por todo amor e apoio, amo vocês!

Às minhas irmãs **Hallana** e **Amanda** pelo apoio e incentivo.

À amiga **Talita** pelo apoio de sempre e pela ajudinha com resumo em inglês.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida e por possibilitar a realização desse trabalho.

RESUMO

Hesperidina é um flavonoide natural encontrado em frutas cítricas especialmente em casca de laranja e limão. Investigou-se o potencial antimutagênico desse composto contra os efeitos citotóxicos e mutagênicos induzidos pela droga antineoplásica cisplatina (CddP) utilizando o ensaio do micronúcleo em eritrócitos de medula óssea de camundongos (*Mus musculus*). Foram utilizados três protocolos: pré-tratamento com hesperidina (via gavagem) por 14 dias, seguido da aplicação (via intraperitoneal) da CddP no 14^o dia; pós-tratamento com a administração da CddP e 24 horas depois a administração da Hesperidina e tratamento simultâneo com aplicação de Hesperidina e CddP por 24 horas. Foram avaliadas três concentrações da Hesperidina diluídas em óleo de milho (100 mg.kg⁻¹, 200 mg.kg⁻¹ e 400 mg.kg⁻¹). Para os controles foram realizados o controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (CddP 0,05mg.kg⁻¹) e controles do solvente (óleo de milho). Para o teste de micronúcleo, os animais foram eutanasiados e foi realizada a coleta da medula óssea. As amostras foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas. As lâminas foram preparadas, pelo método de esfregaço, com uma gota da suspensão e fixadas por 10 minutos com metanol, a coloração foi feita com corante Leishman. A leitura foi feita em teste cego, foram analisadas 2000 células por animal em microscópio óptico para a avaliação dos eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCs) e da razão PCE/(PCE+NCE) (eritrócitos policromáticos/eritrócitos policromáticos + eritrócitos normocromáticos). Todos os protocolos estudados apresentaram redução na quantidade de micronúcleos, quando comparados ao CP e alcançaram altos índices de redução de danos causados pela cisplatina, exceto na concentração de 400 mg.kg⁻¹ do protocolo de tratamento simultâneo, onde tal efeito protetivo não foi observado indicando que a hesperidina tem ação quimioprotetiva sobre a molécula de DNA. Sabe-se que diversos flavonoides tem a capacidade de eliminar radicais livres como radicais hidroxil gerados por agentes químicos que causam danos ao DNA, porém o mecanismo exato de como a hesperidina atua ainda não é esclarecido.

Palavras-chave: Hesperidina. Cisplatina. Antimutagenicidade. Teste do micronúcleo. Flavonoides.

ABSTRACT

Hesperidin is a flavonoid naturally found in citrus fruit especially orange and lemon peel. We investigated the antimutagenic activity of this compound against the cytotoxic and mutagenic effects induced by the anticancer drug cisplatin (CddP) using the micronucleus assay in bone marrow erythrocytes of mice (*Mus musculus*). We used three protocols: pre-treatment with hesperidin (by gavage) for 14 days, followed by applying (intraperitoneally) from CddP no 14th day; Post-treatment administration of CDDP and 24 hours after the administration of hesperidin and simultaneous treatment with hesperidin and CddP. We evaluated three concentrations of Hesperidin diluted in corn oil ($100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $400\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The controlling was conducted by the negative control (NaCl 0,9%), positive control (CddP $0,05\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and the solvent controls (corn oil). For micronucleus test, the animals were euthanized 24 hours following the last treatment by cervical dislocation, and bone marrow was collected. The samples were transferred to Falcon tubes and centrifuged. Slides were prepared by smear technique with a drop of suspension and fixed with methanol for 10 minutes, staining was performed with Leishman stain. The reading was performed in blind test, we analyzed 2000 cells per animal in an optical microscope for evaluation of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) and the ratio $\text{PCE}/(\text{PCE}+\text{NCE})$ (polychromatic erythrocytes/polychromatic erythrocytes + normochromatic erythrocytes). All protocols studied showed a reduction in the number of micronuclei when compared to CP and achieved high rates of reduction of damage caused by cisplatin, except the concentration of $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of the simultaneous treatment protocol where such protective effect was not observed indicating that hesperidin has chemoprotective action on the DNA molecule. It is known that various flavonoids have the ability to eliminate free radicals such as hydroxyl radicals generated by chemical agents that cause DNA damage, but the exact mechanism of how hesperidin acts is not yet clear.

Key words: Hesperidin. Cisplatin. Antimutagenicity. Micronucleus assay. Flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica dos flavonoides	13
Figura 2 – Hidrólise da hesperidina em hesperitina	17
Figura 3 – Cinética da hesperidina.....	17
Figura 4 – Fórmula estrutural da Cisplatina.....	18
Figura 5 – Formação de aductos no DNA pela ação da CddP.....	25
Figura 6 – Mecanismo de formação de eritrócitos policromáticos, normocromáticos e micronúcleos.	26
Figura 7 – Esquema ilustrativo do protocolo de pré - tratamento.....	28
Figura 8 – Esquema ilustrativo do protocolo do tratamento simultâneo	32
Figura 9 – Esquema ilustrativo do protocolo de Pós-tratamento.....	33
Figura 10 – Esquema ilustrativo dos controles utilizados.....	34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Estimativas para os anos 2012/2013 de novos casos de câncer para o estado Espírito Santo e a capital Vitória.....22
- Tabela 2 – Grupos Experimentais31
- Tabela 3 – Efeitos da administração da hesperidina na frequência de MNPCE por 2000 células, na relação de $PCE/(PCE+NCE)$ e a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de pré tratamento.... **Erro! Indicador não definido.**38
- Tabela 4 – Efeitos da administração da hesperidina na frequência de MNPCE por 2000 células, na relação de $PCE/(PCE+NCE)$ e a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de simultâneo..... **Erro! Indicador não definido.**41
- Tabela 5 – Efeitos da administração da hesperidina na frequência de MNPCE por 2000 células, na relação de $PCE/(PCE+NCE)$ e a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de pós-tratamento... **Erro! Indicador não definido.**42

LISTA DE SIGLAS

AIRC	(do inglês <i>American Institute of Cancer Research</i>)
ANOVA	análise de variância (do inglês <i>analysis of variance</i>)
AP	proteína tumor-ativadora 1 (do inglês <i>activator protein 1</i>)
CddP	cisplatina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CN	controle negativo
CP	controle positivo
CS	controle do solvente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonuclei acid</i>)
EP	erro padrão
RO	reativa de oxigênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
m.c	massa corpórea
MNPCE	eritrócito policromático micronucleado (do inglês <i>micronucleated polychromatic erythrocytes</i>)
N ⁷	nitrogênio 7
NCE	eritrócito normocromático (do inglês <i>normochromatic erythrocytes</i>)
NFkb	fator pró-inflamatório nuclear KB (do inglês <i>nuclear factor kappa beta</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCE	eritrócito policromático (do inglês <i>polychromatic erythrocytes</i>)

RNA ácido ribonucléico (do inglês *ribonucleic acid*)

UFES Universidade Federal do Espírito Santo

UV ultra violeta

v.i via intraperitoneal

v.g via gavage

WRCF *World Cancer Research Foudation*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Flavonoides.....	13
1.2 Hesperidina.....	16
1.2.1 Hesperidina e ação quimioprotetiva.....	18
1.3 Mutagênese: Câncer e quimioprevenção.....	19
1.3.1 Câncer: Um problema de saúde pública.....	21
1.3.2 Quimioprevenção do câncer.....	23
1.4 Agentes alquilantes: Cisplatina.....	24
1.5 Teste do micronúcleo.....	27
2 OBJETIVOS.....	29
2.2 Gera.....	29
2.2 Específicos.....	29
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 Reagentes.....	30
3.2 Ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos.....	30
3.2.1 Cisplatina.....	30
3.2.2 Hesperidina.....	30
3.2.3 Animais.....	31
3.2.4 Grupos experimentais.....	31
3.2.5 Tratamentos.....	32
3.2.5.1 Pré-tratamento.....	32
3.2.5.2 Tratamento simultâneo.....	33
3.2.5.3 Pós-tratamento.....	33
3.2.5.4 Controles.....	34
3.2.6 Preparação histológica.....	35
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Pré - tratamento.....	37
4.2 Tratamento simultâneo.....	39
4.3 Pós -tratamento.....	43
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÃO.....	50
7 REFERÊNCIAS.....	52

INTRODUÇÃO

1.1 FLAVONOIDES

Descobertos em 1930, os flavonoides são metabólitos secundários polifenólicos que compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural encontrados praticamente em todos os vegetais tais como frutas, legumes, chás, chocolates, vinhos e sucos (SIMÕES et al., 2000). Eles ocorrem na forma de agliconas, quando não apresentam ligações com açúcares, ou na forma de glicosídeos, quando estão ligados a açúcares. Atualmente, há mais de 6000 tipos de flavonoides descritos constituindo, assim, o grupo polifenólico mais diversificado entre os produtos de origem vegetal (MARCHAND, 2002; YANG et al., 2001).

A distribuição dos flavonoides nos vegetais depende de alguns fatores de acordo com classe taxonômica do vegetal assim como da variação entre as espécies. Geralmente, flavonoides encontrados nas folhas diferem dos encontrados em frutos, flores e raízes assim como a sua concentração (SIMOES et al., 2000). Estruturalmente, a maioria dos flavonoides possui 15 átomos de carbono em seu núcleo básico, sendo compostos fenólicos arranjados na configuração C₆-C₃-C₆, ou seja, dois anéis benzênicos ligados por 3 carbonos unitários que podem ou não formar um terceiro anel, ligado a vários substituintes (Figura 1).

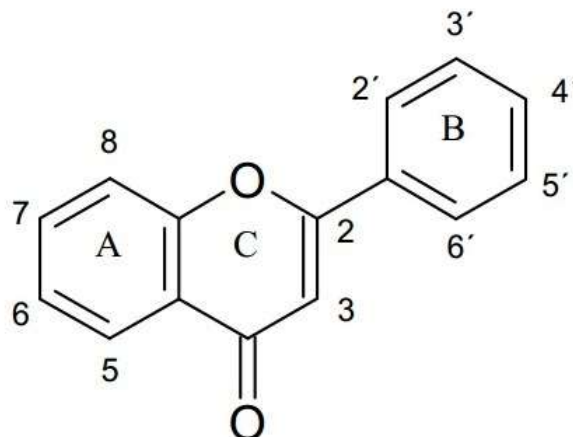


Figura 1 – Estrutura básica dos flavonoides (ROMAGNOLO e SELMIN, 2012).

Os flavonoides são divididos em subclasses que dependem da sua classe estrutural, grau de hidroxilação, outras substituições e conjugações além do grau de polimerização. Na tabela 1 observam-se as estruturas dos flavonoides comumente encontrados na dieta humana.

Quadro 1- Flavonoides presentes na dieta humana (ROMAGNOLO e SELMIN, 2012).

Subclasse	Componentes	Fontes alimentares
Flavonol	Kaempferol, mirecetina e quercetina	Cebola, couve, brócolis, maçã, cereja, berries, erva-doce
Flavonas	Apigenina, luteonina	Aipo, salsa, tomilho, pimentão vermelho
Flavononas	Hesperidina, naringina	Cítricos e ameixas
Flavono-3-ol	Catequina, epicatequinas e epigallocatequinas	Maçã e cacau
Antocianidina	Cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina	Cereja e uva
Isoflavonas	Genisteína, daidzeína, gliciteína, formononetina e biocanina A	Grãos de soja e legumes

Nos vegetais inúmeras funções têm sido atribuídas aos flavonoides, em especial, sua atividade antioxidante, ou seja, a capacidade de retardar ou inibir a oxidação de outras moléculas, evitando assim, o início ou a propagação de reações de oxidação em cadeia (WASZCZYNSKYJ, 2004). Estudos tem mostrado que, em relação às plantas os flavonoides podem agir contra danos causados por radiação UV em folhas jovens, como antioxidantes, inibidores enzimáticos e inibindo e atuando na

resistência das plantas contra patógenos como fungos, insetos e bactérias (PEZZUTO; PARK, 2012; CATHERINE; PACKER, 2003).

Embora não sejam totalmente compreendidos aos olhos da farmacologia moderna, os flavonoides apresentam importantes e inúmeras propriedades terapêuticas, além da sua atividade antioxidante, é relado na literatura a atividade antiinflamatória, antialérgica, antiviral, bactericida, analgésica, antidiabética e imunestimulante desses compostos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Além disso, durante as últimas décadas, estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação inversa entre o consumo de vegetais e frutas e o desenvolvimento de uma grande variedade de condições fisiopatológicas relacionadas com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como doenças neurodegenerativas, câncer, envelhecimento e diabetes. Estas EROs são altamente prejudiciais ao organismo, pois atacam macromoléculas biológicas tais como os lipídios, proteínas e o DNA, induzindo oxidação e provocando danos nas membranas celulares, inativação de enzimas e danos ao DNA (WASZCZYNSKYJ, 2004).

Estudos realizados por Cook e Samman (1995) mostraram que alguns flavonoides possuem ação quimioprotetiva contra o câncer, por indução de enzimas de detoxificação e ativação do sistema imunológico, além de efeitos protetores em patologias cardiovasculares, por meio da prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, importantes na formação de ateromas, e também, atividade vasodilatadora e de diminuição da adesão e agregação de placas ateroscleróticas.

Reddy e colaboradores (2003) observaram que os flavonoides e isoflavonoides podem inibir o ciclo celular e induzir a apoptose, quando linhagens de células cancerosas de cólon, em divisão, foram tratadas com esses compostos e apresentaram uma desestruturação nos “check-points” G1/S e G2/M, sendo flavonoide quercetina responsável pelo bloqueio em G1/S e pela apoptose, este último resultado da fragmentação nuclear e condensação da cromatina nuclear.

Em 2003, Suhr revelou que, em relação aos cânceres, os flavonoides podem interferir na ativação do fator pró-inflamatório nuclear KB (NFkb) e da proteína tumor-ativadora 1 (AP-1) ambos responsáveis pela apoptose e interrupção do ciclo celular. Apesar de vários anos de pesquisas, as propriedades farmacológicas dos flavonoides não estão completamente elucidados e novos estudos toxicológicos aliados aos avanços da biologia molecular, devem ser realizados para se estudar as

amplas variedades estruturais desses compostos bem como a capacidade de interação com outras substâncias.

1.2 Hesperidina

A hesperidina é uma flavonona glicosilada encontrada abundantemente em frutas cítricas, especialmente na casca e em partes membranosas da laranja e do limão (MANACH et al., 2003). Ela tem demonstrado diversas atividades biológicas como: redução da fragilidade capilar (ZHANG et al., 2007), ação antioxidante (HIRATA et al., 2005), efeitos anti-hipertensivos e analgésicos (GALATI et al., 1994) e hipocolesterolemizante (MONFORT et al., 1995).

Descoberta em 1827, por Lebreton, a hesperidina é metabolizada em hesperitina na presença de β glicosidase antes de ser absorvida no epitélio intestinal e fígado (AMEER et al., 1996). A estrutura e hidrólise da hesperidina estão demonstradas na Figura 2.

A cinética da hesperidina é demonstrada na Figura 3, na qual se observa sua detecção 06 horas após a sua administração e seu pico máximo é alcançado entre 9 e 12h. Além disso, o autor relata que a hesperidina não é tóxica, mesmo em tratamentos com altas doses e tempos de administração prolongados. (Yamada, 2006).

Nielsen e colaboradores (2006) descreveram duas hipóteses acerca da absorção de hesperidina no intestino delgado: Primeiro, a hesperidina glicosilada é hidrolisada pela enzima lactase florizina hidrolase e a aglicona livre se difunde passivamente pelas células epiteliais por difusão facilitada; alternativamente, a molécula glicosídea pode ser transportada para o enterócito, via transportador de açúcar SGLT-1 e logo ser desglicosilado pela enzima β glicosidase presente nas células intestinais. Ambas as vias de absorção dão origem a agliconas intracelulares que passam a ser conjugadas com glucoronídeos ou sulfatos. A Figura 4 ilustra o possível caminho de absorção da hesperidina e hesperitina. Estas hipóteses corroboram a idéia de que a alta solubilidade da hesperitina ou mesmo de compostos sintéticos (G-hesperidina) tenham melhor absorção e conseqüentemente, maior atividade (YAMADA, 2006).

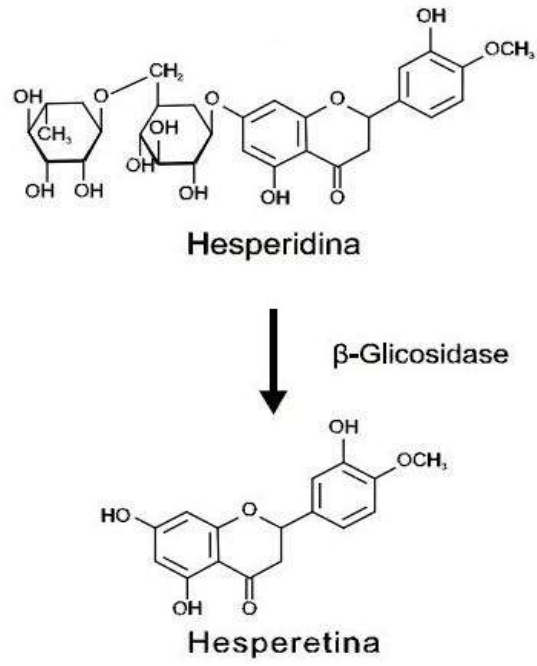


Figura 2: Hidrólise da hesperidina em hesperitina (Yamada, 2006).

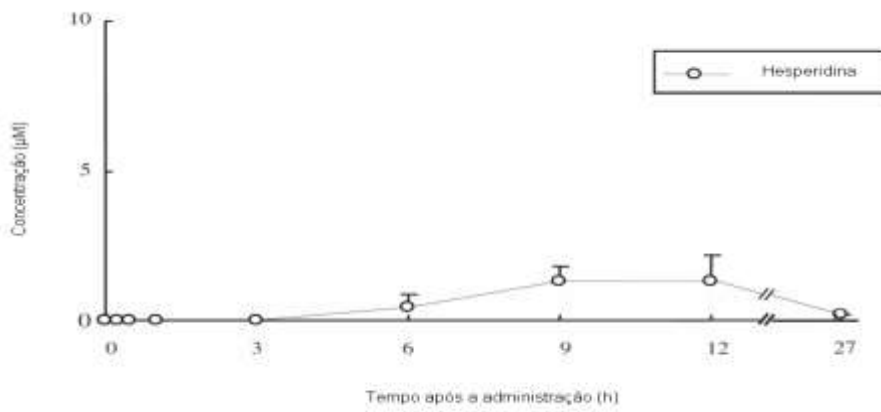


Figura 3: Cinética da hesperidina (Modificado de Yamada, 2006).

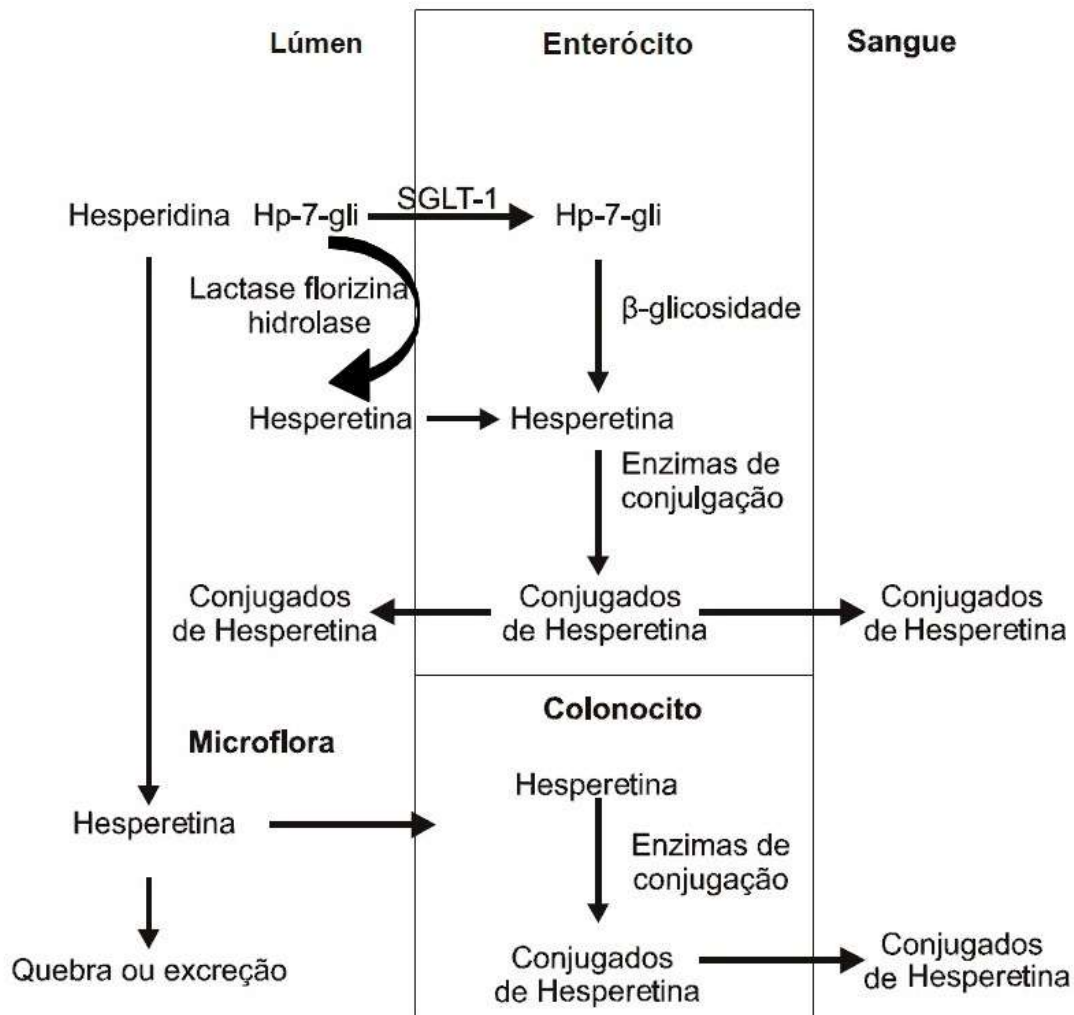


Figura 4 - Possível via de absorção da hesperidina e hesperitina (Adaptado de Nielsen e colaboradores, 2006).

1.2.1 Hesperidina e ação quimioprotetiva.

A maioria dos estudos com hesperidina abordam a sua atividade antioxidante, condição comum aos flavonoides, mas nem todos abordam a sua capacidade quimioprotetiva (MAJUMDAR E SRIRANGAM, 2009).

Nesta abordagem, vale ressaltar alguns estudos, como os de Tirkey, em 2005, que demonstram um efeito protetor da hesperidina contra o estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono, em fígado e rim de ratos. Em 2008, Ahmadi e colaboradores, também apontam a hesperidina como um potente quimioprotetor,

contra danos induzidos por ciclofosfamida, em medula óssea de camundongos. Estas situações indicam uma possível ação biológica importante, pois a quimioproteção é uma intervenção com compostos naturais ou sintéticos não tóxicos para prevenir ou atrasar o desenvolvimento de doenças pré-malignas (YANG et al., 1997).

Além disso, a suplementação com hesperidina aliviou a disfunção mitocondrial gerada por radicais livres, em camundongos, com câncer de pulmão induzido por benzopireno (KAMARAJ, 2010) e apresentou, em ratas com câncer de mama, uma atividade anticarcinogênica, quando foi utilizado o antraceno, por eliminar a peroxidação lipídica e ao normalizar o estado de enzimas marcadoras, o teor de proteínas e os níveis de DNA e RNA através da eliminação dos radicais livres gerados por aquele mutágeno (NANDAKUMAR et al, 2011).

Tanaka e colaboradores (1997) mostraram que a hesperidina foi capaz de reduzir a incidência de neoplasias e pré-neoplasmas na língua de ratos com câncer de boca induzido por 4-nitroquinolina 1-óxido. Esses estudos e ações indicam que sua ação quimioprotetiva envolve ações antimutagênicas.

Choi relatou (2007) em seu estudo que a hesperidina foi capaz de interromper o ciclo celular na fase G1 de células cancerosas de mama. Yeh e colaboradores (2009) também reportaram ação da hesperidina, que inibiu a expressão do gene MMP-9 envolvido no câncer de fígado.

Baseado em todos os benefícios que a hesperidina têm mostrado, ressaltando seu potencial quimioprotetivo e antimutagênico e na ausência de toxicidade desse composto, a avaliação de sua atividade contra um mutágeno como a cisplatina é de grande valia para a compreensão de seus benefícios quanto à proteção do material genético.

1.3 Mutagênese: Câncer e Quimioprevenção

Mutagênese é a ciência que estuda o processo de danos ao DNA pela ação de agentes químicos, físicos e biológicos. Estes danos são comumente medidos como mutações, aberrações cromossômicas, quebras de fita de DNA, aductos ou por interferências no mecanismo de reparo (GUYTON et al., 2008).

As mutações são definidas como qualquer alteração súbita no material genético da célula e podem alterar processo vitais tais como segregação e recombinação gênica,

além de contribuir para o surgimento de processos tumorais e morte celular (RABELLO–GAY, 1991). Apesar de seus efeitos deletérios, por alterar as condições estabilizadas das células e, conseqüentemente, dos órgãos e indivíduos, as mutações gênicas são importantes para a evolução biológica, pois elas produzem uma diversidade genética que pode ser expressa como uma variabilidade de características, as quais serão selecionadas ou não pelas condições do ambiente.

Qualquer célula pode sofrer mutação, tanto germinativas quanto somáticas, apenas as mutações da linhagem germinativa são passadas para as gerações seguintes e são responsáveis pelas doenças hereditárias. Mutações nas células somáticas, entretanto, são mais frequentes e provocam alterações diretas no indivíduo portador como a proliferação celular e envolver-se com o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis tais como ateroscleroses, doenças cardíacas e câncer (DE FLORA e FERGUSON, 2005).

Todas as alterações no material genético são passíveis de correção pelo mecanismo de reparo do DNA. A quantidade, a fase do ciclo celular, a eficiência do reparo e os tipos de reparo atuantes em cada célula são fatores que determinam uma mutação (WANG, 2009).

Um agente genotóxico é aquele que pode causar lesões genômicas que são passíveis de reparo, no entanto se o reparo não for eficiente estas lesões podem resultar em mutação (GONTIJO, 2003).

Há na natureza, diversos agentes físicos, químicos, ou mesmo biológicos, que ocasionam danos ao DNA, esses erros quando fixados são considerados uma mutação, sendo assim, um agente mutagênico é aquele que induz um dano que não é passível de reparo e é transmitido célula a célula durante a proliferação celular (WANG et al., 2009).

O desenvolvimento de várias das formas mais comuns de câncer resulta de uma interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo o mais notável desses fatores a dieta (MOON; SHIBAMOTO 2009). Acredita-se que cerca de 35% dos diversos tipos de câncer ocorrem em razão de dietas inadequadas que apresentam em sua composição mutágenos já reconhecidos. Dietas ricas em gorduras, alimentos industrializados, carnes vermelhas entre outros estão relacionados com a elevada frequência de câncer de estômago, mama, cólon, próstata, pâncreas, ovário e endométrio (FRANCY – GUILFORD; PEZZUTO, 2008).

Pesquisas apontam que a maioria dos carcinógenos são mutágenos indicando assim uma grande correlação entre a mutagênese e a carcinogênese (MACGREGGOR et al, 2000).

Como os agentes mutagênicos estão direta ou indiretamente ligados à carcinogênese, a possibilidade de controle da resposta celular contra os mesmos, principalmente através da dieta, tem aberto uma nova fronteira para a prevenção e controle do câncer. Uma nova estratégia para reduzir sua incidência relaciona-se com a identificação de compostos quimioprotetivos que poderiam funcionar como anticarcinogênicos.

1.3.1 Câncer: um problema de saúde pública

O câncer é um problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos quanto nos subdesenvolvidos. Estima-se que nos Estados Unidos a cada quatro mortes uma é devida ao câncer (SIEGEL et al, 2012). Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) são diagnosticados anualmente cerca de dez milhões de casos de câncer na população mundial, sendo o mesmo o responsável por aproximadamente seis milhões de óbitos. (WHO, 2012). No Brasil, segundo o *National Cancer Institute* dos EUA, o câncer é a terceira principal causa de morte, ficando depois das doenças do aparelho circulatório e causas externas (NCI, 2012).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas para os anos 2012/2013 apontam mais de 500 mil novos casos de câncer no Brasil e mais de 10 mil casos no estado do Espírito Santo (INCA, 2011). A tabela 2 demonstra a incidência de novos casos de câncer no estado e na capital Vitória.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que no ano de 2030 podem-se esperar 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer.

Nesse cenário, torna-se fundamental que os recursos e esforços sejam direcionados no sentido de orientar as estratégias de prevenção e controle de câncer.

Como os agentes mutagênicos estão direta ou indiretamente ligados a carcinogênese, a possibilidade de controle da resposta celular contra os mesmos através da dieta ou de medicamentos, tem aberto uma nova fronteira para a prevenção e controle do câncer (TRICHOPOULOU et al, 2005; HALLIWELL, 2007, apud FILHO et al., 2011), desta forma a identificação de agentes inibidores de

mutação deverá ser útil na descoberta de novos compostos anticarcinogênicos (JOVANOVIC; SIMIC, 2006).

Tabela 1- Estimativas para os anos 2012/2013 de novos casos de câncer para o estado Espírito Santo e a capital Vitória (INCA, 2011b).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capital		Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	1.310	74,37	130	82,54	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	900	49,42	130	71,28
Colo do Útero	-	-	-	-	340	18,65	40	20,30
Traqueia, Brônquio e Pulmão	300	17,07	40	24,58	160	8,96	20	11,85
Cólon e Reto	260	14,62	50	29,13	310	16,84	60	33,46
Estômago	320	18,15	30	21,44	160	8,96	20	13,11
Cavidade Oral	260	14,86	30	18,26	120	6,79	20	10,36
Laringe	140	7,91	**	9,75	-	-	-	-
Bexiga	110	6,11	**	3,61	50	2,86	**	6,36
Esôfago	240	13,39	20	14,64	80	4,33	**	3,61
Ovário	-	-	-	-	110	5,92	20	9,49
Linfoma não Hodgkin	100	5,67	**	6,45	90	4,89	**	8,01
Glândula Tireoide	-	-	-	-	290	16,03	30	14,76
Sistema Nervoso Central	110	6,21	**	6,43	90	5,05	**	5,79
Leucemias	90	4,89	**	6,61	70	3,81	**	4,03
Corpo do Útero	-	-	-	-	50	2,88	**	4,22
Pele Melanoma	60	3,41	**	6,89	80	4,35	**	6,00
Outras Localizações	840	47,69	90	60,88	750	41,35	90	49,08
Subtotal	4.140	234,94	450	287,17	3.650	201,03	500	282,54
Pele não Melanoma	1.270	72,38	100	63,67	1.680	92,78	180	102,98
Todas as Neoplasias	5.410	307,00	550	350,98	5.330	293,56	680	384,26

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10 / ** Menores que 15 casos

1.3.2 Quimioprevenção do câncer

Devido à complexidade, alta mortalidade e crescente incidência de câncer no mundo, a prevenção é o método mais adequado para o controle dessa doença (SPORN;SUHR, 2002).

Nas décadas de 60 e 70, surgiram indícios de que o câncer estava relacionado a fatores ambientais, e que, portanto, poderia ser prevenido. Nessa época, diversos epidemiologistas observaram os efeitos da imigração e das mudanças de hábito nas populações juntamente com modificações nos tipos de câncer (ALCÁNTARA, 2007; SPECKMANN, 2006).

Desse modo, em 1981, Doll e Peto publicaram uma importante revisão relatando que o câncer era passível de prevenção ao observar que as diferentes taxas de incidência de câncer entre os países poderiam ser atribuídas, em partes, aos fatores ambientais e ao estilo de vida, como fumo, comportamento reprodutivo, exposição ocupacional a carcinógenos e alimentação.

Em 1997, o *American Institute of Cancer Research* (AIRC) e a *World Cancer Research Foudation* (WRCF) chegaram a um consenso científico sobre a prevenção do câncer, reafirmando as observações de Doll e Peto em 1981.

DeFlora e Ferguson (2005) discorreram sobre as três formas para se prevenir o câncer: a prevenção primária, aplicada a indivíduos saudáveis e que inclui, portanto, a inibição da iniciação e promoção; a prevenção secundária direcionada a pacientes em estágios precoces da doença, podendo inibir a etapa de conversão da neoplasia benigna em maligna; e a prevenção terciária, com a qual se evitam metástases ou recidivas do câncer.

Em vista disso, o mais adequado seria o bloqueio dos agentes causadores, ou seja, a prevenção primária do câncer (SPORN; LIBY, 2005), possível apenas em alguns casos, como por exemplo, o tabagismo (VINEIS et al., 2004) ou na aplicação de vacinas contra determinados tipos de câncer (LOLLINI et al., 2006). Porém, na maior parte das situações esse objetivo se torna inviável, já que estamos constantemente expostos a diversos agentes que podem agir a diferentes estágios da carcinogênese (HURSTING et al., 1999) e, além disso, mais de 50% das causas de neoplasias malignas humanas ainda são desconhecidas (WATTENBERG, 1997). Porém, Doll e Peto (1981) já haviam concluído que as modificações na alimentação poderiam reduzir em 35 % a mortalidade por câncer nos Estados Unidos. Assim após revisão

e análise de todos esses dados reunidos, referente à dieta, nutrição e câncer acumulados na literatura, diversos cientistas publicaram, dentre outras conclusões que a incidência de câncer no mundo pode ser reduzida em 30-40%, através de alterações adequadas na alimentação e estilo de vida (WCRF/AIRC, 2007).

Diversos estudos epidemiológicos ou com animais já enfocaram a relação direta entre dieta e diversos tipos de câncer tais como pulmão, cólon, mama, próstata, estômago, esôfago, bexiga entre outros (PARK e PEZZUTO, 2012; IMAI et al., 2009; PICK et al., 2012; TANG et al., 2009; WILSON et al., 2009; HOU e KUMAKOTO, 2010; FOSCHI et al., 2009; ROSSI et al., 2010; ARROO et al., 2002; ACIKELLI et al., 2012). Sendo que o consumo de vegetais em especial frutas, hortaliças e fibras revelaram ter um efeito protetor, ao contrário da ingestão de gorduras e carne vermelha (ROMAGNOLLO e ORNELLA, 2012). Esse efeito protetor se deve principalmente à ação de compostos bioativos presentes nesses alimentos (MILNER, 2004).

Nesse sentido, insere-se o conceito da quimioprevenção, relatado pela primeira vez por Sporn e colaboradores em 1976. Segundo Wattenberg (1997) a prevenção é o método mais apropriado para se evitar o câncer e consiste na prevenção, inibição ou reversão das etapas iniciais da carcinogênese, ou seja, antes da progressão, pela administração de um ou mais compostos químicos sintéticos ou naturais (STONER; MORSE, KELLOFF, 1997).

Assim, diversos compostos bioativos presentes em alimentos apresentam atividade quimiopreventiva dentre eles, diversos tipos de flavonoides (DAVIS, 2004; ROMAGNOLLO e ORNELLA, 2012) e é essencial que se prossiga a busca de novos mecanismos que elucidem a influência desses compostos no câncer contribuindo para os esclarecimentos de aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, além de promover um grande impacto em estratégias de prevenção (AMES e GOLD, 1995; YAO et al., 2004; SURH, 2003).

1.4- Agentes alquilantes: Cisplatina

A Cisplatina (CddP) é um fármaco antineoplásico alquilante muito empregado em tratamentos de câncer, principalmente de ovário, próstata, esôfago, bexiga, mama,

cabeça e pescoço e pulmão (BODO et al.,2005, CHANEY et al., 2004, KARTALOU; ESSIGMAN, 2001; WAN; LIPPARD, 2005).

A CddP possui em sua estrutura (Figura 5) um átomo central de platina envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia. Torna-se ativada dentro da célula por substituição dos íons cloreto pela água, e esta forma é muito reativa nos centros nucleofílicos de biomoléculas como RNA e DNA, proteínas e membranas fosfolipídicas (CHO et al.,2008; JAMIENSON; LIPPARD, 1999; WANG; LIPPARD, 2005).

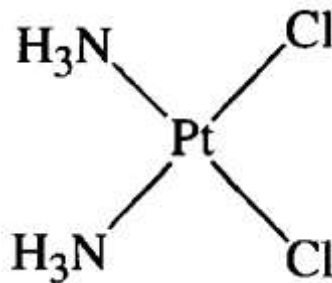


Figura 5 – Fórmula estrutural da Cisplatina (FONTES e ALMEIDA, 1996).

O efeito antineoplásico da CddP se deve a sua interação com o DNA, onde a cisplatina se liga a posição N⁷ das purinas (Figura 6), formando aductos que vão se transformar em ligações cruzadas (“cross-links”) inter e intracadeia os quais são responsáveis pela citotoxicidade e mutagenicidade da cisplatina. Os aductos formados interferem na duplicação do DNA pelo bloqueio da enzima DNA polimerase e também pode inibir a transcrição, resultando em bloqueio do ciclo celular e apoptose (NADIN et al; 2005 WOZNIAK et al.,2004).

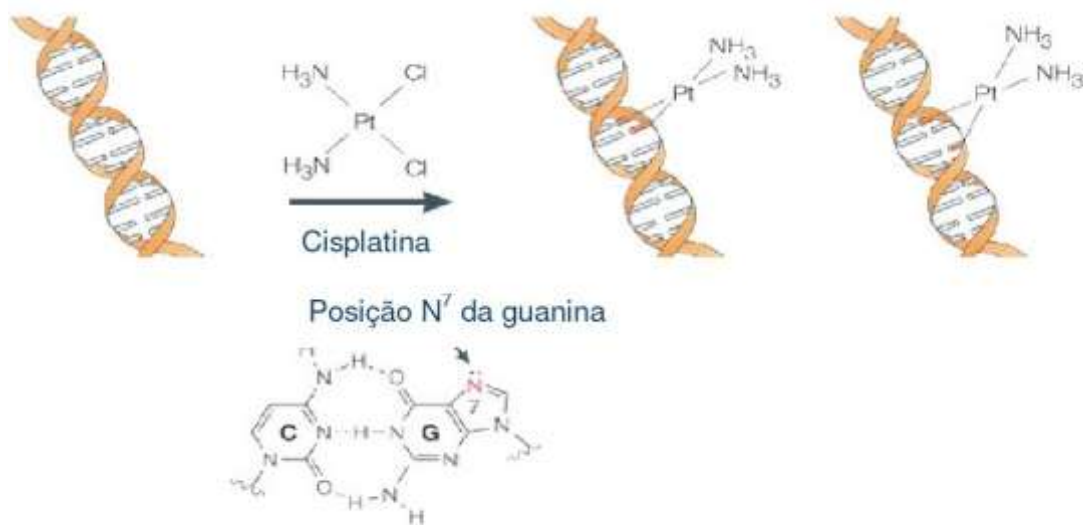


Figura 6 – Formação de aductos no DNA pela ação da CddP (Adaptado de LIPPARD, 2005).

Entretanto, esse fármaco tem seu uso limitado na prática clínica em função dos seus efeitos colaterais como nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, supressão da medula óssea e mutagenicidade (GENTILI et al., 2001).

Segundo Antunes e colaboradores (2000) a CddP é altamente mutagênica, causa troca de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas em células de mamíferos em cultura, em células da medula óssea de ratos e em linfócitos sanguíneos periféricos de humanos.

Vários compostos antioxidantes da dieta tem sido testados para minimizar os efeitos mutagenicos da CddP. O pré - tratamento com curcumina ou vitamina C reduziu a clastogenicidade em células da medula óssea de ratos Wistar, mas não apresentou efeito sinérgico quando estas foram administradas em associação (ANTUNES, 2000).

O carotenoide Bixina foi testado em diversas concentrações sobre a cisplatina em células de medula de ratos Wistar. A dose mais baixa de bixina provocou uma redução de 21% em relação às metáfases alteradas pela cisplatina, enquanto que a dose mais alta de bixina foi mais eficiente, diminuindo a frequência de aberrações cromossômicas e metáfases alteradas induzidas por CddP em aproximadamente 33% (SILVA et al., 2001).

Mora e colaboradores (2002) mostraram que administração de uma dose única de glutamina em ratos foi eficiente na redução da genotoxicidade causada pela ação da CddP.

Tendo em vista o potencial antimutagênico do flavonoide hesperidina, este trabalho visa verificar um possível efeito protetor deste composto, o que poderá no futuro possibilitar seu uso em associação com cisplatina, reduzindo os efeitos danosos deste agente antineoplásico.

1.4 Teste do micronúcleo

Micronúcleos são fragmentos cromossômicos formados a partir de quebras ou de cromossomos inteiros que se atrasaram na anáfase, e podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a divisão nuclear. O índice de micronúcleos em células humanas ou de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos mais empregados na rotina dos testes de genética toxicológica dos agentes químicos e radiações *in vivo* e *in vitro*. Os micronúcleos podem ser analisados em eritrócitos, células da mucosa oral ou linfócitos para a estimativa do dano genético *in vivo* (HAYASHI, 1983).

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos, isto é, que geram quebra cromossômica, e de agentes aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (HAYASHI et al., 2007). Por este parâmetro pode-se avaliar a capacidade de substâncias para induzir dano cromossômico estrutural e/ou numérico em células em divisão na medula óssea.

Na medula óssea, durante o processo de divisão celular, os eritroblastos sofrem duplicação final dos cromossomos diferenciando-se em eritrócitos policromáticos (PCE) (Figura 7). Estes eritrócitos jovens são ricos em ribossomos e, por isso, são facilmente corados diferenciando-se assim dos eritrócitos maduros que não possuem ribossomos (NCE). Na presença de agentes mutagênicos, os fragmentos cromossômicos resultantes de quebras no DNA podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose, originando assim o micronúcleo. Este por sua vez permanece no citoplasma e pode ser facilmente visualizado em eritrócitos policromáticos.

Levando em consideração que o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, qualquer micronúcleo que ele contenha tem grande probabilidade de ter sido gerado recentemente, na presença da substância que causou o dano (SCHMID, 1976).

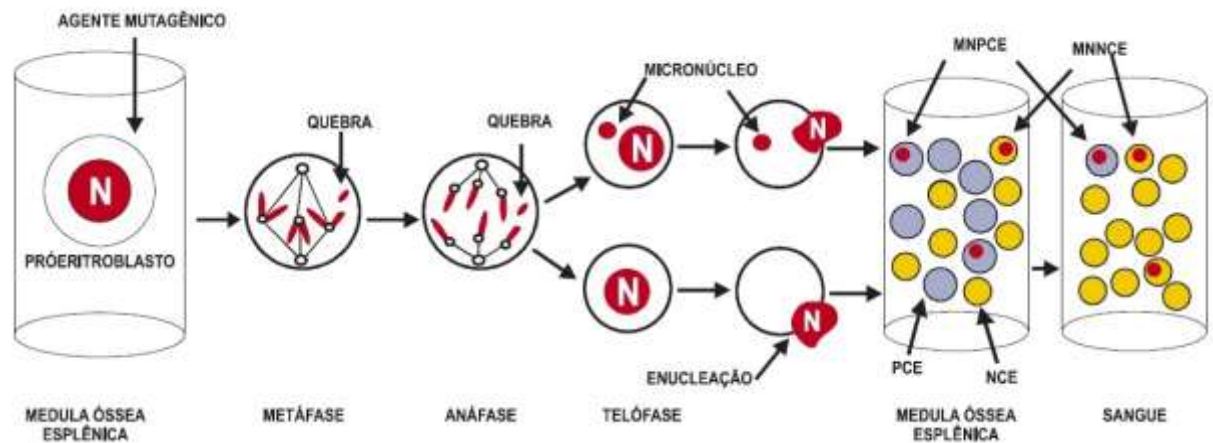


Figura 7 – Mecanismo de formação de eritrócitos policromáticos, normocromáticos e micronúcleos (Adaptado de Krishna e Hayashi, 2000).

No ensaio de micronúcleo, a relação de PCE em relação ao total de eritrócitos (PCE+NCE) entre o grupo de animais tratados e o grupo controle fornece o índice de citotoxicidade, e o número de MNPCE fornece o índice mutagenicidade (KRISHINA; HAYASHI, 2000). A citotoxicidade é indicada por uma redução significativa na percentagem de PCE (RIBEIRO, 2003).

Por suas características vantajosas, essas análises tornaram-se imprescindíveis em estudos que objetivam a avaliação tanto de efeitos danosos dos diversos agentes, quanto das possíveis ações corretivas ou preventivas de drogas e outros agentes, sendo validada como procedimento em avaliações pré-clínicas e triagens (MORSE; STONER, 1993).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito antimutagênico do flavonoide hesperidina contra os danos induzidos pelo agente mutagênico cisplatina em camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)*, por meio do Teste do micronúcleo.

2.2 Específicos

- Avaliar, por meio do teste de micronúcleo *in vivo*, o efeito antimutagênico do flavonoide hesperidina nas concentrações 100 mg.kg⁻¹, 200 mg.kg⁻¹ e 400 mg.kg⁻¹, utilizando os protocolos de tratamento simultâneo, pré- tratamento e pós-tratamento;
- Investigar o efeito da hesperidina nas concentrações selecionadas contra à citotoxicidade induzida por cisplatina nos protocolos de tratamento simultâneo, pré- tratamento e pós-tratamento, por meio da relação entre o número de eritrócitos policromáticos e o número total de eritrócitos;
- Verificar e comparar os resultados obtidos nos experimentos, separando-se e combinando-se os gêneros.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Para a realização dessa pesquisa foram utilizados os seguintes reagentes: Hesperidina (Sigma-Aldrich, USA), Soro bovino fetal (Gibco – Invitrogen Ltda, Brasil); Cisplatina (Fauldcispla[®], Libbs), Eosina azul de metileno segmento Leishman (Cromoline, Brasil); Metanol (Vetec, Brasil), todos em elevado índice de pureza.

3.2 Ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos

O ensaio do micronúcleo foi conduzido conforme o protocolo descrito por Schmid (1975) e adaptados por Krishna e Hayashi (2000). Este trabalho de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES, processo 001/2011, Anexo A).

3.2.1 Cisplatina

O agente indutor de danos ao DNA empregado no Controle positivo desta pesquisa foi a droga Cisplatina (CddP), na concentração de 5 mg.kg⁻¹ de massa corpórea (m.c) administrado por via intraperitoneal (v.i).

3.2.2 Hesperidina

A hesperidina foi administrada nas seguintes concentrações: 100 mg.kg⁻¹, 200 mg.kg⁻¹ e 400 mg.kg⁻¹ via gavagem (v.g). Neste trabalho foi utilizado o óleo de milho como veículo uma vez que a hesperidina é insolúvel em água.

3.2.3 Animais

Foram utilizados 120 camundongos *Swiss (Mus musculus)*, 60 machos e 60 fêmeas, com idade entre 6 a 8 semanas e aproximadamente 30g provenientes do biotério do Programa de Pós – graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas forradas com maravalha e mantidos em sala climatizada, ciclo de claro-escuro de 12h controlados. Água filtrada e ração comercial foram fornecidas *ad libitum*. Os animais passaram por um período de aclimação de 7 dias no biotério de passagem antes do início dos experimentos.

3.2.4 Grupos Experimentais

Para a realização dos protocolos experimentais os animais foram subdivididos aleatoriamente em 6 grupos e separados por sexo conforme demonstrado abaixo: a tabela abaixo:

Tabela 2: Grupos Experimentais (n=10) por grupo.

Grupo	Sexo	n	Tratamento
Controle negativo (CN)	M	5	NaCl 0,9 %; 0,01 mL.g ⁻¹ m.c
	F	5	
Controle Solvente (CS)	M	5	Óleo de milho; 0,01 mL.g ⁻¹ m.c
	F	5	
Controle positivo (CP)	M	5	Cisplatina (CddP) 5mg.kg ⁻¹ m.c
	F	5	
Hesperidina 100 mg.kg ⁻¹	M	5	Hesperidina 100 mg.kg ⁻¹ , óleo de milho 0,01mL.g ⁻¹ m.c + CddP
	F	5	
Hesperidina 200 mg.kg ⁻¹	M	5	Hesperidina 200 mg.kg ⁻¹ , óleo de milho 0,01mL.g ⁻¹ m.c + CddP
	F	5	
Hesperidina 400 mg.kg ⁻¹	M	5	Hesperidina 400 mg.kg ⁻¹ , óleo de milho 0,01mL.g ⁻¹ m.c + CddP
	F	5	

M= machos; F= fêmeas; m.c= massa corpórea; n= número de animais.

3.2.5 Tratamentos:

A avaliação do efeito antimutagênico da hesperidina contra os danos induzidos pela CddP foi realizado através dos protocolos pré-tratamento, pós-tratamento e tratamento simultâneo.

Para todos os tratamentos foram utilizados um controle positivo e um controle negativo.

O controle solvente foi incluído para avaliar uma possível influencia do óleo de milho na atividade da hesperidina. Os protocolos serão explicados detalhadamente a seguir.

3.2.5.1 Pré - tratamento:

Este protocolo foi realizado segundo de Ribeiro e Colaboradores (2003) com algumas adaptações. Os camundongos foram tratados, por gavagem, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, durante 14 dias com hesperidina nas concentrações de 100,200 e 400 mg.kg⁻¹. No 14º dia de tratamento os animais receberam, via intraperitoneal, o mutágeno CddP (5 mg.kg⁻¹) e 24 horas depois foi realizada a eutanásia por deslocamento cervical conforme ilustração abaixo:

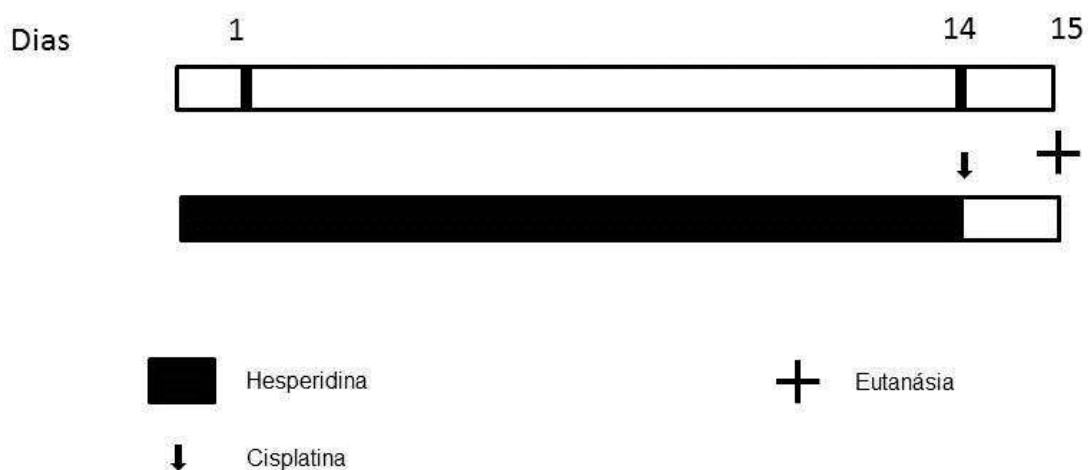


Figura 8: Esquema ilustrativo do protocolo de pré - tratamento

3.2.5.2 Tratamento simultâneo

No tratamento simultâneo a hesperidina foi administrada, em suas respectivas concentrações, uma única vez e em seguida os camundongos receberam via intraperitoneal a CddP (5 mg.kg^{-1}), 24 horas após foi realizada a eutanásia conforme ilustra o esquema a seguir:

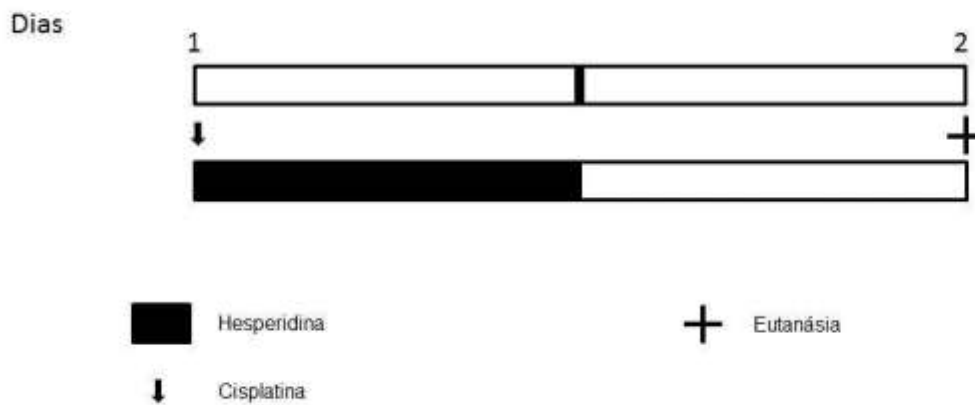


Figura 9: Esquema ilustrativo do protocolo do tratamento simultâneo.

3.2.5.3 Pós – tratamento

Seguindo o protocolo de pós tratamento os camundongos primeiramente receberam uma dose de Cisplatina (5 mg.kg^{-1}), 24 horas após receberam uma dose de hesperidina em suas respectivas concentrações e a eutanásia foi realizada após 24 horas conforme ilustra o esquema abaixo:

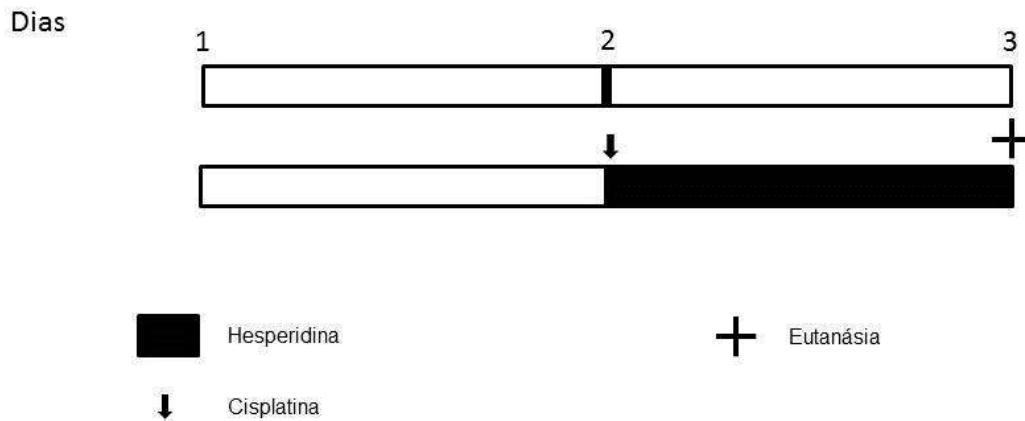


Figura 10: Esquema ilustrativo dos controles utilizados neste trabalho.

3.2.5.4 Controles

Foram realizados neste trabalho os controles negativo (CN), positivo (CP) e o controle do solvente óleo de milho (CS). Para o CN os camundongos receberam uma única dose de solução salina NaCl 0,9% e 24 horas após foram eutanasiados. Os animais do CP receberam a CddP e 24 horas depois foi realizada a eutanásia. Para o controle do solvente CS os animais receberam uma dose do óleo de milho ($0,01 \text{ mL.g}^{-1} \text{ m.c}$) e 24 horas após foram eutanasiados. O esquema abaixo ilustra como os controles foram utilizados:

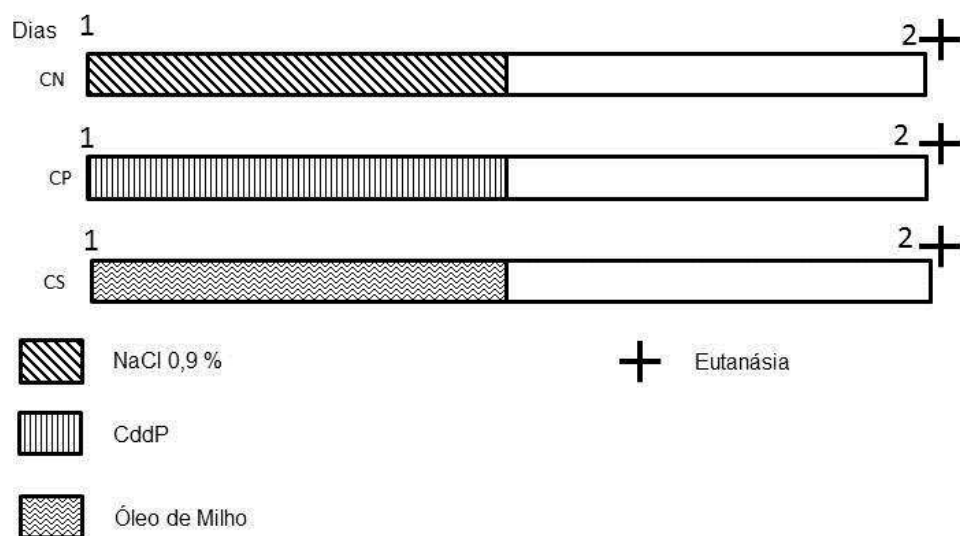


Figura 11: Esquema ilustrativo dos controles utilizados neste trabalho.

3.2.6 PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA

Após realização da eutanásia por deslocamento cervical é feita uma incisão na pele dos animais para a retirada dos fêmures. As epífises distais são cortadas para expor o canal da medula e com auxílio de uma seringa preenchida com 0,5 mL de soro bovino fetal esse canal passa por um enxague, injetando-se o soro, para transferir amostras da medula para o interior de um tubo falcon.

A amostra contida no tubo falcon, devidamente identificada, é submetida à centrifugação por 10 minutos a 1000 rpm, com auxílio de uma pipeta pasteur o sobrenatante é descartado e o material é submetido novamente a centrifugação.

Os esfregaços foram preparados adicionando-se uma gota da suspensão na lâmina (previamente identificada) e com o auxílio de outra lâmina inclinada num ângulo de 45°, de acordo com a metodologia utilizada por Ribeiro et al (2003).

Utilizaram-se efetivamente duas lâminas limpas para realização de cada esfregaço e se fizeram dois esfregaços por animal. Depois de secas a temperatura ambiente, as preparações foram fixadas em Metanol, durante 10 minutos e novamente deixadas para secar ao ar (APÊNDICES A e B).

A coloração das lâminas foi feita com corante Leishman onde foram diferenciados os tipos celulares eritrócitos policromáticos (PCE), eritrócitos normocromáticos (NCE) e eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE). (APÊNDICE C).

A leitura foi feita em teste cego em microscópio óptico no aumento de 100x (imersão). As lâminas de todos os animais (grupos tratados e controles), foram analisadas pelo mesmo observador de modo a eliminar erros de análise, como recomendam Ribeiro et al (2003). Para a análise da antimutagenicidade da hesperidina contra os danos causados pelo agente cisplatina foram analisadas 2000 PCE's por animal (1000 por lâmina) anotando-se a frequência de MNPCE's. A análise de citotoxicidade foi avaliada pela razão de PCE no total de 200 eritrócitos (PCE + NCE), através da fórmula $PCE/(PCE+NCE)$. Toda a análise obedeceu aos critérios estabelecidos por Krishna e Hayashi (2000).

A porcentagem de redução de danos (diminuição da frequência média de células micronucleadas) nas diferentes concentrações e protocolos, foi calculada de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Waters et al. (1990), usando a fórmula:

$$(\%) \text{ Redução} = \frac{\text{frequência de MNPCEs em A} - \text{frequência de MNPCEs em B}}{\text{frequência de MNPCEs em A} - \text{frequência de MNPCEs em C}} \times 100$$

onde “A” é o grupo de células tratadas com CddP (controle positivo); “B” é o grupo de células tratadas com hesperidina e “C” é o grupo controle negativo (NaCl 0,9%). Para a análise estatística dos resultados foi empregado o teste de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) no qual foram comparados entre si os números de MNPCEs e de um Teste de Student para a análise das relações PCE/NCE. Para avaliação pareada dos sexos, machos e fêmeas, foi aplicado o Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software Assistat 7.6 beta.

4 RESULTADOS

O número de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs), assim como o percentual de redução foram determinados, a partir da contagem de 2000 eritrócitos policromáticos por animal, perfazendo um total de no mínimo 10.000 células, por grupo de tratamento, pois a avaliação da redução dos micronúcleos em eritrócitos tem sido utilizada como ferramenta fundamental para a verificação da atividade antimutagênica em vários estudos.

As tabelas 3, 4 e 5 apresentam os resultados do efeito da hesperidina contra os danos induzidos por cisplatina em eritrócitos de medula óssea de camundongos. Os resultados foram avaliados por meio da frequência de micronúcleos e a relação entre o número de eritrócitos policromáticos no total de eritrócitos (PCE/PCE+NCE) bem como a porcentagem de redução de danos nos diferentes tratamentos.

Como esperado, o número de MNPCs encontrados no CP (1161) foi estatisticamente superior ao grupo CN (42), no entanto, os resultados da frequência de MNPCs encontrados para o CN (42) e controle do solvente (43) foram muito próximos indicando que o veículo utilizado não interfere na atividade da hesperidina. A avaliação da efetividade de um agente como antimutagênico é realizada sob diferentes condições, verificando sua ação nas condições de pré-tratamento, pós-tratamento e sua ação simultânea à ação do mutágeno, com o objetivo de avaliar os diferentes modos de ação de um antimutagênico, no sentido de expor sua ação preventiva, o que caracteriza os tratamentos pré e simultâneo como desmutagênicos ou sua ação corretiva, no pós-tratamento, onde os agentes atuam por meio de um mecanismo de bio-antimutagênese, relacionados, portanto, ao processo de reparo das mutações (RIBEIRO, 2003.)

4.1 PRÉ TRATAMENTO

Os resultados obtidos no protocolo pré-tratamento estão apresentados na tabela 3. Os números de MNPCs, para os grupos nas concentrações de 100 mg.kg⁻¹; 200 mg.kg⁻¹ e 400 mg.kg⁻¹ foram respectivamente 431, 562 e 475. Para os machos, a concentração que mostrou menor frequência de micronúcleos foi a de 100 mg.kg⁻¹

(145) já para as fêmeas a concentração foi a de 400 mg.kg^{-1} (235). As porcentagens de redução de danos para as concentrações de 100 mg.kg^{-1} ; 200 mg.kg^{-1} e 400 mg.kg^{-1} foram 65,24%; 53,53% e 61,30% respectivamente. Porém quando analisada a razão $\text{PCE}/(\text{PCE}+\text{NCE})$ não observa-se diferença estatística em nenhum das doses ou grupos estudados sugerindo que a associação de hesperidina com cisplatina não reduziu a citotoxicidade e que sua ação não diferiu entre os sexos.

Tabela 3: Efeitos da administração da hesperidina na frequência de MNPCE por 2000 células, na relação de PCE/(PCE+NCE) e a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de **pré tratamento**.

Tratamento	Número de PCEs	MNPCE			PCE/(PCE+NCE) ± EP			% Redução		
		Machos	Fêmeas	Grupo (M+F)	Machos	Fêmeas	Grupo (M+F)	Machos	Fêmeas	Grupo (M+F)
NaCl 0,9% ¹	19154	26 ^e	16 ^e	42 ^f	0,57 ± 0,005	0,54 ± 0,009	0,56 ± 0,004	-	-	-
Óleo de Milho ²	19073	27 ^f	16 ^e	43 ^e	0,48 ± 0,003	0,51 ± 0,001	0,49 ± 0,004	-	-	-
Cisplatina ³ (5mg.kg ⁻¹ m.c.)	18201	573 ^a	588 ^a	1161 ^a	0,60 ± 0,001	0,61 ± 0,010	0,61 ± 0,008	-	-	-
Hesperidina (100 mg.kg ⁻¹ m.c.)	19128	145 ^d	286 ^b	431 ^d	0,69 ± 0,007	0,72 ± 0,001	0,70 ± 0,04	78,24	52,80	65,24
Hesperidina (200 mg.kg ⁻¹ m.c.)	18741	293 ^b	269 ^c	562 ^b	0,61 ± 0,001	0,52 ± 0,012	0,57 ± 0,010	51,18	55,76	53,53
Hesperidina (400 mg.kg ⁻¹ m.c.)	18838	240 ^c	235 ^d	475 ^c	0,56 ± 0,013	0,64 ± 0,013	0,60 ± 0,006	60,87	61,71	61,30

Letras iguais representam semelhança estatística (ANOVA, Teste de Kruskal - Wallis, $P < 0,05$)

Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para análise de variância entre os sexos.

¹ controle negativo; ² controle do solvente da droga; ³ controle positivo.

M: machos; F: fêmeas; EP = Erro Padrão.

4.2 TRATAMENTO SIMULTÂNEO

Os resultados para o protocolo do tratamento simultâneo estão apresentados na tabela 5. Para a análise dos números de eritrócitos micronucleados observa-se que em todos os grupos estudados houve uma redução no número de micronúcleos quando comparados ao CP, porém a análise estatística mostrou, quando realizada separando-se os gêneros, que tanto para o grupo de machos quanto o das fêmeas tratados com a maior concentração da hesperidina (400 mg.kg^{-1}) a frequência de MNPCs encontrados se igualou estatisticamente ao CP. Os números de micronúcleos dos grupos nas concentrações 100 mg.kg^{-1} , 200 mg.kg^{-1} e 400 mg.kg^{-1} foram respectivamente 258; 109 e 1101. O menor número de MNPCs, quando analisado por gênero, tanto nos machos quanto nas fêmeas foi encontrado na concentração de 200 mg.kg^{-1} (64 e 45 respectivamente). Quanto a porcentagem de redução de danos, a concentração de 400 mg.kg^{-1} não foi capaz de reduzir os danos induzidos pela cisplatina já para as concentrações de 100 mg.kg^{-1} e 200 mg.kg^{-1} a redução foi de respectivamente 80,7% e 94,01%. Neste tratamento, assim como no pré-tratamento, não houve redução da citotoxicidade em nenhuma das doses ou grupos avaliados, ou mesmo na comparação entre os gêneros.

4.3 PÓS- TRATAMENTO

A tabela 6 sumariza os resultados encontrados no protocolo de pós-tratamento. Ao se analisar os números de MNPCs dos grupos observa-se que todos foram efetivos em reduzir a frequência de micronúcleos, sendo diferentes estatisticamente do CP. Observa-se também neste protocolo uma relação dose-dependente entre as concentrações e a frequência de micronúcleos onde as concentrações 100 mg.kg^{-1} , 200 mg.kg^{-1} e 400 mg.kg^{-1} apresentaram os respectivos números de micronucleos 294; 233 e 164 sugerindo que nestas condições a concentração de 400 mg.kg^{-1} é a mais efetiva. O mesmo foi observado nas análises dos grupos de machos e fêmeas. As porcentagens de redução de danos dos grupos tratados com hesperidina nas concentrações de 100 mg.kg^{-1} ; 200 mg.kg^{-1} e 400 mg.kg^{-1} foram de 77,48%; 82,93% e 90,08%, respectivamente. Neste tratamento, como nos demais, não houve redução ou mesmo aumento da citotoxicidade quando do tratamento com a hesperidina, em nenhuma das condições avaliadas. Na comparação dos resultados,

entre os gêneros, também não foram observadas diferenças, entre machos e fêmeas no que se refere a nenhum dos parâmetros avaliados, no que se refere às atividades mutagênicas ou citotóxicas.

Tabela 4: Efeitos da administração da hesperidina na frequência de MNPCE por 2000 células, na relação de PCE/(PCE+NCE) e a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de **tratamento simultâneo**.

Tratamento	Número de PCEs	MNPCE			PCE/(PCE+NCE) ± EP			% Redução		
		Machos	Fêmeas	Grupo (M+F)	Machos	Fêmeas	Grupo (M+F)	Machos	Fêmeas	Grupo (M+F)
NaCl 0,9% ¹	19154	26 ^d	16 ^d	42 ^e	0,57 ± 0,005	0,54 ± 0,009	0,56 ± 0,004	-	-	-
Óleo de Milho ²	19073	27 ^e	16 ^d	43 ^f	0,48 ± 0,003	0,51 ± 0,001	0,49 ± 0,004	-	-	-
Cisplatina ³ (5mg.kg ⁻¹ m.c.)	18201	573 ^a	588 ^a	1161 ^b	0,60 ± 0,010	0,61 ± 0,010	0,61 ± 0,008	-	-	-
Hesperidina (100 mg.kg ⁻¹ m.c.)	19000	132 ^b	126 ^b	25 ^c	0,55 ± 0,014	0,57 ± 0,011	0,56 ± 0,006	80,76	80,76	80,7
Hesperidina (200 mg.kg ⁻¹ m.c.)	19168	64 ^c	45 ^c	109 ^d	0,60 ± 0,013	0,57 ± 0,019	0,59 ± 0,008	93,05	94,93	94,01
Hesperidina (400 mg.kg ⁻¹ m.c.)	19219	576 ^a	525 ^a	1101 ^a	0,70 ± 0,009	0,74 ± 0,007	0,72 ± 0,004	0	0	0

Letras iguais representam semelhança estatística (ANOVA, Teste de Kruskal - Wallis, $P < 0,05$)

Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para análise de variância entre os sexos.

¹ controle negativo; ² controle do solvente da droga; ³ controle positivo.

M: machos; F: fêmeas; EP = Erro Padrão.

Tabela 5: Efeitos da administração da hesperidina na frequência de MNPCE por 2000 células, na relação de PCE/(PCE+NCE) e a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de **pós tratamento**.

Tratamento	Número de PCEs	MNPCE			PCE/(PCE+NCE) ± EP			% Redução		
		Machos	Fêmeas	Grupo (M+F)	Machos	Fêmeas	Grupo (M+F)	Machos	Fêmeas	Grupo (M+F)
NaCl 0,9% ¹	19154	26 ^d	16 ^e	42 ^e	0,57 ± 0,005	0,54 ± 0,009	0,56 ± 0,004	-	-	-
Óleo de Milho ²	19073	27 ^e	16 ^e	43 ^f	0,48 ± 0,003	0,51 ± 0,001	0,49 ± 0,004	-	-	-
Cisplatina ³ (5mg.kg ⁻¹ m.c.)	18201	573 ^a	588 ^a	1161 ^a	0,60 ± 0,001	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,008	-	-	-
Hesperidina (100 mg.kg ⁻¹ m.c.)	19154	157 ^b	137 ^b	294 ^b	0,53 ± 0,010	0,75 ± 0,006	0,64 ± 0,007	76,05	78,84	77,48
Hesperidina (200 mg.kg ⁻¹ m.c.)	19053	132 ^b	101 ^c	233 ^c	0,58 ± 0,016	0,55 ± 0,018	0,56 ± 0,010	80,62	85,13	82,93
Hesperidina (400 mg.kg ⁻¹ m.c.)	19125	87 ^c	77 ^d	164 ^d	0,57 ± 0,016	0,56 ± 0,012	0,51 ± 0,01	88,84	87,93	90,08

Letras iguais representam semelhança estatística (ANOVA, Teste de Kruskal - Wallis, $P < 0,05$)

Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para análise de variância entre os sexos.

¹ controle negativo; ² controle do solvente da droga; ³ controle positivo.

M: machos; F: fêmeas; EP = Erro Padrão.

5 DISCUSSÃO

Os flavonoides são compostos polifenólicos que ocorrem na natureza em diversos tipos de plantas. Eles são utilizados como fonte de matéria-prima na indústria farmacêutica e alimentícia e apresentam inúmeras atividades biológicas (YAO et al., 2004; SURH, 2003; HUANG et al., 2010).

De acordo com Huang e colaboradores (2010) o potencial quimioprotetivo dos flavonoides pode estar relacionado com eliminação de radicais livres, inibição da inflamação, indução de enzimas de fase II, supressão da proliferação celular, adesão e invasão, indução da diferenciação celular, inibição do ciclo celular e apoptose e regulação do metabolismo de hormônios esteroides e estrogênio.

Estudos realizados com flavonoides têm mostrado que os mesmos tem a capacidade de reduzir danos no material genéticos induzidos por mutágenos, como mostrado nas pesquisas com catequinas, rutina, curcumina, daidzeína entre outros, que comprovaram a atividade antimutagênica desses compostos por meio de testes *in vivo* e *in vitro* (YAO et al., 2004; AHMADI et al., 2008; ANTUNES et al., 2000).

Entre os flavonoides, a hesperidina tem ganhado atenção especial devido à sua ação quimioprotetiva apontada em estudos como os de Ahmadi e colaboradores (2008), que mostraram que ela é um potente agente quimioprotetivo contra danos induzidos por ciclofosfamida, em medula óssea de camundongos. Com o intuito de ampliar os estudos sobre a atividade quimioprotetiva do flavonoide natural hesperidina, o presente estudo avaliou seus efeitos contra a mutagenicidade induzida por cisplatina, por meio do ensaio de micronúcleo, em eritrócitos de medula óssea de camundongos, *in vivo*.

A cisplatina é um agente antineoplásico usado para o tratamento de tumores sólidos e é mutagênico quando utilizada em sistemas *in vivo*. Demonstrou-se que essa droga aumenta a frequência de micronúcleos, em ratos tratados com 5 mg.kg⁻¹.p.c, não provocando a morte dos animais (ANTUNES et al., 2000b; EDELWEISS et al., 2005)

A via de administração da cisplatina mais utilizada em experimentos é a intraperitoneal, devido sua simplicidade e também por que possibilita maximizar

a exposição dos agentes químicos em células de medula óssea (DELUCIA e OLIVEIRA FILHO, 2004; PRESTON et al., 1987).

As células de medula óssea são adequadas para o uso do efeito mutagênico e antimutagênico de substâncias antioxidantes, pois apresentam um grande número de células mitóticas e extensa rede de vasos sanguíneos, permitindo, assim, um bom contato entre as células e a substância administrada (UMEGAKI et al., 1997).

Um dos fatores a ser considerado em um estudo de antimutagenese é o controle positivo utilizado que deve ser capaz de induzir uma quantidade de danos suficiente, pois caso o teste de antimutagenicidade seja efetivo em reduzir danos, isso será observado na análise dos resultados.

Conforme mostrado nas Tabelas 3, 4 e 5, os animais tratados com o antitumoral cisplatina apresentaram número superior de micronúcleos àqueles apresentados nos controle negativo, solvente e nas concentrações de hesperidina testadas, evidenciando o potencial mutagênico dessa droga, que como já foi relatado por diversos autores, atua por meio da formação de aductos de DNA (SUZUKI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012). Os efeitos mutagênicos da cisplatina demonstrados no tratamento controle positivo, deste estudo, o qual exibiu um alto número de eritrócitos policromáticos micronucleados (588), corroboram outras pesquisas realizadas em células de medula óssea de ratos e camundongos (CIRI et al., 1998; CHOUDHURY e JAGDALE, 2002).

No presente estudo, o óleo de milho foi utilizado como solvente da hesperidina uma vez que este flavonoide é uma molécula apolar e, portanto, não solúvel em água, uma das características que os estudiosos de sua cinética e biodisponibilidade sugerem ser um dos motivos para tornar sua ação menos abrangente e de menor impacto que os efeitos já descritos da hesperidina, o seu principal metabólito, ou mesmo, quando sua atividade é comparada aos flavonoides sintéticos, baseados em sua estrutura, por ex. a G-Hesperidina (YAMADA, 2006).

Os resultados do número de MNPCEs encontrados no grupo controle óleo de milho (43) não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao CN (42), o que demonstra que o solvente não interferiu sobre a proteção da

hesperidina, fato que é confirmado por estudos anteriores que utilizaram o óleo de milho como veículo (HASEMAN et al., 1985; BROWN et al., 2000)

A ação dos antioxidantes como quimioprotetores tem sido investigada por vários autores, assim como, o seu papel protetivo contra danos genômicos ocasionados por diversos mutágenos, dentre eles a cisplatina. Neste sentido, Sugihara e Gemba (1986) demonstraram que os efeitos tóxicos da cisplatina, em ratos, podem ser relacionados aos danos induzidos por radicais livres, e que a administração de vitamina E atenua essa toxicidade, o que pode ocorrer no caso dos humanos, por meio da sua inclusão na dieta.

No mesmo contexto, a administração de curcumina, um flavonoide extraído da Cúrcuma, mostrou-se efetiva na proteção contra a clastogenicidade produzida pela cisplatina, em ratos. Contudo, a associação entre curcumina e vitamina C não foi eficaz contra os danos aos cromossomos desses animais (ANTUNES et al., 2000).

O efeito do carotenoide licopeno, outro metabólito de caráter antioxidante, foi investigado antes e depois da administração de cisplatina, em ratos, e produziu uma melhora efetiva no tratamento do câncer, por evitar a nefrotoxicidade e o estresse oxidativo no plasma e tecidos renais dos animais, sendo que o pré-tratamento, com tal antioxidante mostrou-se mais efetivo (ATESSAHIN et al., 2005).

O carotenoide bixina foi avaliado em um modelo de nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos. Os resultados indicaram que o pré-tratamento com o pigmento reduziu o número de aberrações cromossômicas e inibiu a peroxidação lipídica (SILVA et al., 2001).

Todos esses estudos demonstram claramente que, os flavonoides e os carotenoides podem por meio de sua ação antioxidante auxiliar ou minimizar os efeitos danosos da cisplatina. Assim, a investigação de novos compostos, como a hesperidina, que atuem prevenindo ou corrigindo danos genômicos, como aqueles causados pela cisplatina, ou mesmo de outros mutágenos, se faz útil para o entendimento dos mecanismos de ação dos diversos compostos antimutagênicos e até mesmo para contribuir na descoberta de novas alternativas para o tratamento de pacientes com neoplasias, que precisem ou não se submeter ao tratamento quimioterápico.

Neste estudo, os resultados referentes à redução do número de PCEMNs, corroborados pelo percentual de redução, que alcança altos níveis, na maioria dos tratamentos (pré, pós e simultâneo), apontam na direção de que a hesperidina é um composto promissor, no que se refere ao uso como agente antimutagênico, frente aos danos advindos do uso da cisplatina. A exceção observada pela dose de 400 mg.kg^{-1} , no tratamento simultâneo, poderia ser explicada pela saturação celular durante a sua absorção, mas não foram realizados estudos neste sentido, o que poderá ser explicado com futuros estudos de farmacodinâmica ou mesmo de farmacocinética da hesperidina nas mesmas condições ora avaliadas.

No entanto, quando consideramos a citotoxicidade, não foi observado o mesmo comportamento, ou seja, apesar de sua atividade antimutagênica, a hesperidina não foi capaz de inibir ou corrigir os danos globais causados nas células, como pode ser observado, nas Tabelas 4, 5 e 6. Tal situação também foi observada em estudo com plantas do gênero *Miconia*, ricas em flavonoides e taninos, no qual Serpeloni et al (2008) observaram que o extrato metanólico da planta foi eficaz na redução da mutagenicidade, mas não em relação a citotoxicidade.

Os estudos de Antunes e Araújo (2000) também demonstram que uma determinada droga pode apresentar um efeito antimutagênico, sem, no entanto, expor uma ação anticitotóxica positiva. No caso da hesperidina, os resultados também não indicam que sua interação com a cisplatina tenha sido mais nociva do que quando o mutágeno foi utilizado isoladamente, o que pode ser considerada uma condição positiva, pois alguns compostos ao se interagirem com os mutágenos, muitas vezes, aumentam a sua capacidade citotóxica.

Sugerimos que mecanismos envolvidos na quimioproteção exibida pela hesperidina, no que se refere às ações da cisplatina, possam ser os mesmos envolvidos em suas outras ações protetivas. Apesar de os mecanismos exatos da ação molecular da hesperidina ou dos seus metabólitos ainda não ser totalmente esclarecidos e, mesmo que a maioria dos estudos apontem para as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, como os principais responsáveis por tais ações não há como no presente estudo certificar que esses sejam os reais responsáveis, pois não foram feitos testes ou estudos elucidativos neste sentido.

O reparo por excisão de nucleotídeos é o principal processo pelo qual os adutos de DNA formados pela cisplatina são removidos (JORDAN e CARMO-FONSECA, 2011). Para que este reparo aconteça de forma eficiente é necessário que as enzimas do sistema estejam em pleno funcionamento assim como o estado oxidativo da célula, portanto, neste sentido, a ação dos antioxidantes pode ser a primordial ação. A hesperidina por apresentar uma ação antioxidante pode ajudar na performance das enzimas envolvidas no reparo de ações de substâncias como a cisplatina, uma vez que estas últimas formam adutos de DNA e seu reparo envolve a excisão de bases, por enzimas que podem ter a sua ação melhorada em um ambiente com menor grau de oxidação.

Muitos estudos tem reportado uma associação do uso de hesperidina em células cancerosas por diversos mecanismos (PARK et al., 2008; CHOI, 2007; KARMAJ et al., 2008). Park e colaboradores (2002) reportaram que a hesperidina mostrou um efeito apoptótico em células de câncer de cólon por meio da ativação da enzima caspase -3. Hesperitina, a forma aglicona da hesperidina, interrompeu o ciclo celular na fase G1 em células de câncer de mama (CHOI, 2007).

Segundo Karamaj e colaboradores (2008) a hesperidina mostrou atividade anticarcinogênica em câncer de pulmão induzido por benzopireno atenuando a peroxidação lipídica e varias enzimas marcadoras como hidroxilases.

Uma característica importante dos flavonoides, incluindo a hesperidina, é a atividade antioxidante, consequência de suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar importante papel na absorção e neutralização de radicais livres tais como radicais hidroxil gerados por agentes químicos (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, 2004). O aumento do nível intracelular de ROS, frequentemente referido com estresse oxidativo, representam uma potencial agressão tóxica que interagem com macromoléculas para induzir uma disfunção na membrana celular, peroxidação lipídica e danos ao DNA (WOZNIAK et al., 2004).

Se tivermos uma droga que seja capaz de melhorar a performance das enzimas envolvidas na recuperação dos danos oxidativos causados pela cisplatina esta poderá auxiliar na minimização dos danos causados por ela nas

células da vizinhança do tumor. Uma vez que esses danos são de difícil correção por serem muito instáveis.

O sexo tem sido relatado como um fator a ser considerado nos estudos de mutagênese. Fenech, Neville e Rinaldi (1994) relatam haver uma importante influência do sexo na produção basal de micronúcleos, sendo as mulheres mais predispostas à formação espontânea dessas estruturas. No entanto, a avaliação pareada dos efeitos da hesperidina frente à cisplatina, em relação aos dois gêneros (masculino e feminino), não demonstrou uma variação das respostas em nenhum dos tratamentos e parâmetros avaliados. O que indica mesmo havendo uma influência do gênero nos aspectos gerais da mutagênese, no presente estudo, a hesperidina não tem a sua função influenciada por esse fator.

No entanto, a aplicabilidade da hesperidina na medicina preventiva ainda tem limitações a serem eliminadas, a principal é devido à sua solubilidade extremamente baixa em água. Estudos apontam para a necessidade de métodos alternativos que possam melhorar o desempenho da hesperidina, mas a sua solubilização facilitada em óleo de milho, tem sido uma alternativa.

Morse e Stoner (1993) sugeriram um agente quimioprotetivo deve ter cinco qualidades: 1) Pouco ou nenhum efeito secundário indesejável; 2) alta eficácia; 3) capacidade de administração por via oral; 4) conhecido mecanismo de ação e 5) baixo custo.

A hesperidina cumpre todos os critérios exceto o número 4. Muitos estudos são necessários a respeito das propriedades do flavonoide hesperidina como um agente quimiopreventivo, mas nossos resultados sugerem que a hesperidina atua no sistema de defesa antioxidante, mas que, provavelmente não é o único mecanismo pelo qual a hesperidina protege o DNA contra os danos gerados pela cisplatina.

Esses promissores resultados *in vivo*, aliados a estudos moleculares, podem elucidar a interação desse composto na saúde humana, contribuindo para que no futuro a hesperidina seja incluída como forma de tratamento na quimioprevenção de câncer em seres humanos, mas há necessidade de reconhecer que estudos mais profundos e com outros organismos testes ainda contribuirão muito, mesmo antes de caminharmos na direção dos estudos clínicos.

6 CONCLUSÕES

Foi realizada, neste estudo, a avaliação do potencial antimutagênico do flavonoide hesperidina contra os danos induzidos pelo agente antineoplásico cisplatina em eritrócitos de medula óssea de camundungos *in vivo* e, conforme os resultados obtidos, é possível concluir que:

- O mutágeno cisplatina induziu a um aumento, estatisticamente significativo, na quantidade de micronúcleos em relação ao controle negativo (NaCl 0,9%);
- O controle do solvente, neste caso o óleo de milho, não diferiu estatisticamente do controle negativo (NaCl 0,9%) em relação à quantidade de micronúcleos, se mostrando um bom veículo para compostos insolúveis em água, tal qual a hesperidina;
- Todas as concentrações de hesperidina utilizadas nesta pesquisa (100; 200 e 400 mg.kg⁻¹) conseguiram reduzir efetivamente a quantidade de micronúcleos induzidos pelo mutágeno cisplatina nos protocolos utilizados (pré tratamento, pós tratamento e tratamento simultâneo), sugerindo que a hesperidina ofereceu um efeito protetor (antimutagênico) contra os danos mutagênicos induzidos por cisplatina;
- Não foi observada nenhuma diferença estatística significativa entre as relações PCE/NCE, nos protocolos realizados, sugerindo que a hesperidina, nestas condições experimentais, não é citotóxica.
- Todos os protocolos estudados apresentaram altos índices de redução de danos causados pela cisplatina, exceto na concentração de 400 mg.kg⁻¹ do protocolo de tratamento simultâneo, onde tal efeito protetivo não foi observado;

- Não houve diferença entre os sexos, quando comparados os resultados da atividade antimutagênica (PCEMNs), da citotoxicidade (PCE/NCE) e do percentual de redução dos danos, indicando que o sexo não interfere no comportamento da hesperidina e de sua ação quimioprotetiva;
- Mais estudos são necessários para compreender o real mecanismo de como a hesperidina atua para que no futuro esse promissor composto seja utilizado na prevenção e no tratamento contra danos induzidos por cisplatina em seres humanos.

7 REFERÊNCIAS

ACIKELLI, A.H. et al. Flavonoids isolated from Caribbean propolis show toxicity activity in human cancer cell lines. **Int. J. Clin. Pharmacol.**, v.51, n.1, p.51-53, 2012.

AHMADI, A. et al. Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, n. 6, p. 794-797, 2008

AIRC - AMERICAN INSTITUTE OF CANCER RESEARCH. Disponível em <<http://airc.org/>>. Acesso em 18 de dezembro de 2012.

ALCANTARA, E.N; SPECKMANN, E. Diet, nutrition, and câncer. **Perspect. Nut.**,v. 29, n.1, p.1035-1047, 1976.

ALCANTARA , P. et al. Prostate-specific antigen nadir within 12 months of prostate cancer radiotherapy predicts metastasis and death. **Cancer.** v.109, n.1, p. 41-47, 2007.

AMEER et al. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 60, n.1, p. 34–40, 1996.

AMES, B. N.; GOLD, L. S. The Causes and Prevention of Cancer: Gaining Perspective. **Environ. Health Perspect.**, v.105, n.4, p.865-873, 1997.

ANTUNES, L.M.G. et al. Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. **Mutat. Res.**, v. 465, p. 131-137, 2000.

ANTUNES, L. M. G.; ARAUJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Rev. Nutr.**, v.13, n.2, p. 81-88, 2000.

ARROO, L.M. et al. Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. **Phytoch. Rev.**, v.1, n.1, p. 27-35, 2002.

ATESSAHIN, A. et al. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. **Toxicol.**, v. 212, n.2, p.116-123, 2005.

BODO, J. Sensitisation for cisplatin-induced apoptosis by isothiocyanate E-4IB leads to signalling pathways alterations. **Br. J. Cancer.**, v. 95, n.1. p.1348-1353, 2006.

BROWN, A.P. et al. Stress Produced by Gavage Administration in the Rat. **J. Am. Assoc. Lab. Anim.** v.39, n.1 p.17-21, 2000.

CATHERINE, A. R.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease.** 2ed. New York: Basel, 2003.

CHANEY et al. Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. **Eur. J. Inorg. Chem.**, v.98, n.10, p.1551-1559, 2004.

CHO, J.M et al. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance. **Cancer Lett.**, v. 120, n.2, p. 96-108, 2008.

CHOI, E.J. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. **Nutr Cancer.**, v. 59, n.1, p. 115-119, 2007.

CHOUDHURY, R.C; JAGDALE, M.B. Cytogenetic toxicity of cisplatin in bone marrow cells of swiss mice. **J. Chemother.**, v.12, n.2, p.137-182, 2000.

CIRI, A. et al. Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. **Mutat. Res.**, v. 421, n.1, p. 139-148, 1998.

COOK, N. C.; SAMMAN, C. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutr. Biochem.**, v.7, p.66-76, 1995.

DeFLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat. Res.**, v. 591, p. 8-15, 2005.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Vis. Acadêm.**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DELUCIA, R., OLIVEIRA-FILHO, R. M. **Farmacologia Integrada**. Rio de Janeiro: Revinter,2004.

DOLL, R.; PETTO, R.; The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, n.6, p. 1192-1308, 1981.

EDELWEISS, M.I. et al. Clastogenic effect of cisplatin on Wistar rat bone marrow cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, n.6, p.679-683, 1995.

FILHO, P.R.; FERREIRA, L.A.; GOUVÊA, C.M.C.P. Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens* ("barbatimão") leaf extracts. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 21, n. 6, p. 1000-1005, 2011.

FONTES, A.P.S; ALMEIDA, S.G. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. **Quim. Nova.**, v. 20, n.4, p.399-406, 1997.

FOSCHI, J. et al. Citrus fruit and cancer risk in a network of case-control studies. **Cancer Causes Control.**, v.21, n.2, p. 237-242, 2010.

FRANCY – GUILFORD. J; PEZZUTO, J.M. Mechanisms of cancer chemopreventive agents: a perspective. **Planta Med.**, v.74, n.13, p. 1644-1650, 2008.

GALATI, E.M. et al. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. **Farmaco.**, v.40, n.11, p. 709-712, 1994.

GENTILE, J.M. et al. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. **Mutat. Res.**, v. 402, p. 289-298, 1998.

GONTIJO, A.M.M.C; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R; SALVADORI, D.M.F; MARKES, E.K. **Mutagenese Ambiental.**, Canoas: Ulbra, 2003.

GUYTON, K.Z et al. Improving prediction of chemical carcinogenicity by considering multiple mechanisms and applying toxicogenomic approaches. **Reviews in Mutat. Res.** Doi:10,1016/j.mrrev.2008.10.001, 2008.

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytoch.**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HASEMAN, J.K et al. Neoplasms Observed in Untreated and Corn Oil Gavage Control Groups of F344/N Rats and (C57BL/6N x C3H/HeN)F₁ (B6C3F₁) Mice. **J. Natl .Cancer Inst.**, v.75, n.5, p. 975-984, 1985.

HAYASHI, M. et al., An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutat. Res.**,v. 120, n.4, p.241-247, 1983.

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

HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R. A.; BOBILYA, J. D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr Biochem.**, v. 13, n.1, p. 572-584, 2002.

HIRATA, A. et al. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. **Anticancer. Res.** v.25, n. 1, p.3367–3374, 2005.

HOU, D; KUMAMOTO, T. Flavonoids as Protein Kinase Inhibitors for Cancer Chemoprevention: Direct Binding and Molecular Modeling. **Antioxid. Redox. Sign.**, v. 13, n. 5, p. 691-719, 2010.

HUANG, B. et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extracts of edible lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaves. **Food Chemist.**, v. 20, n.3, p.873-878, 2010.

HURSTING, S.D. et al. Energy balance and carcinogenesis: Underlying pathways and targets for intervention. **Curr. Cancer Drug Targets.**, v.7, n.1, p.484-491, 2007.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer ?**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> Acesso em: 15 dez. 2012a.

_____. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 15 de dez. 2012b.

JAMIESON, E. R; LIPPARD, S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. **Chem. Rev.**, v. 99, n.1, p.2467-2498, 1999.

JORDAN, P; CARMO-FONSECA, M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.57, n.9, p.1229-1235, 2000.

JOVANOVIC, S. V. et al. Flavonoids as anti-oxidants. **J. Am. Chem. Soc.** v.116, n.1, p.4846-4851, 1994.

JOVANOVIC, S.V.; SIMIC, M.G. Antioxidants in Nutrition. **Ann. NY Acad. Sc.**, v.899, n.1, p.326-334, 2006.

KAELFER, C.M; MILNER, J.A. The role of herbs and spices in cancer prevention. **J. Nutr. Biochem.**, v.19, n.6, p.347-361, 2008.

KAMARAJ, S et al. Hesperidin attenuates mitochondrial dysfunction during benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in mice. **Fundam. Clin Pharm.**, v.25, n.1, p. 91-98, 2011.

KARTALOU, M; ESSIGMANN, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutat. Res.**, v.478, n.2, p.23-43, 2001.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat. Res.**, n. 455, p. 155-166, 2000.

LOLLINI, P. et al., Discovery of cancer vaccination protocols with a genetic algorithm driving an agent based simulator. **Biomed. Central.**, v.7, n.1, p.1-9, 2006.

MACGREGGOR, J.T. et al. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutat. Res.**, v.455, n.2, p. 3-20, 2000.

MAJUMDAR, S; SRIRANGAM, R. Solubility, Stability, Physicochemical Characteristics and *In Vitro* Ocular Tissue Permeability of Hesperidin: a Natural Bioflavonoid. **Pharm. Res.**, v. 26, n.5, p. 1217–1225, 2009.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **J. Clin. Nutr.**, v. 89, n.1, p.2305-2425, 2005.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. β -Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biol. Intern. Reports.**, v. 9, n. 8, p. 783-789, 1985.

MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonoides – a review. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, p. 296-301, 2002.

MONFORTE, M.T. et al. Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. **Farmacol.**, v.50, n.9, p.595-599, 1995.

MOON, J; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, n.5, p.1655-1666, 2009.

MORA, L.D.O. et al, The effects of oral glutamine on cisplatin-induced genotoxicity in Wistar rat bone marrow cells. **Mutat. Res.**, v.518, n.1, p.66-70, 2002.

MORSE, M.A; STONER G.D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinog.**, v.14, n.9, p.1737-1746, 1993.

NADIN, S.B. et al. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from health individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Lett.**, v.61, n.6, p.338-346, 2007.

NANDAKUMAR, N. et al. Hesperidin, a natural citrus flavonoglycoside, normalizes lipid peroxidation and membrane bound marker enzymes in 7,12-Dimethylbenz (a) anthracene induced experimental breast cancer rats. **Biomedic. Prev. Nutrit.**, v.1, n.1, p. 255-262, 2011.

NCI – NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Parceiro da rede de pesquisa sobre o câncer nos Estados Unidos - América Latina (US-LA CRN):** Brasil. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/aboutnci/organization/olacpd/portugues/br/crn/brasil>>. Acesso em: 3dez, 2012.

NIELSEN, I.L.F. et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification on the citrus flavonoid hesperidin in humans: A randomized, double-blind, crossover trial. **J. Nutr.**, v.136, n.1, p.404-408, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em: <<http://www.who.int/es/>>. Acesso em: 3 dez. 2012.

PARK, E.J; PEZZUTO, J.M. Botanicals in Cancer Chemoprevention. **Cancer Metast. Rev.**, v.21, n.3, p.231-255, 2002.

PRESTON, R. J. et al. Mammalian *in vivo* cytogenetic assays: analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. **Mutat. Res.**, v. 189, p. 157-165, 1987.

RABELLO-GAY, M.N. et al. The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophosphamide in mouse bone marrow. **Mutat. Res.**, v. 3, n. 158, p. 181-188, 1985.

REDDY, L. et al. Natural products for cancer prevention: A global prespective. **Pharmacology. Therapeutics.**, v. 99, p. 1-13, 2003.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K (Org). **Mutagênese Ambiental**. 1 ed. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

RODRIGUES, M.A. et al., Carvedilol protects against cisplatin-induced oxidative stress, redox state unbalance and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Chem. Biol. Interact.**, v. 189, n.2, p.45-51, 2011.

ROMAGNOLO, D. F.; SELMIN, O.I. Flavonoids and Cancer Prevention: A Review of the Evidence. **J. Nutr. Gerontol. Geriatr.**, v.31, n.3, p.206-238, 2012.

ROSSI, M. et al. Flavonoids, proanthocyanidins, and cancer risk: a network of case-control studies. **Nutr. Cancer.**, v. 62, n.7, p.871-877, 2010.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SERPELONI, J.M. et al. Avaliação *in vivo* da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo. **Semina Ciênc. Biol. Saúde**, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2008.

SIEGEL, R.M.H. et al. Cancer Statics, 2012. **Cancer J. Clin.**, v.62, n.1,p. 10-29, 2012.

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

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2ª ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, 2000.

SPORN, M.B. et al, Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Fed. Proceed.**, v.35, n.6, p.1332-1338, 1976.

SPORN, M.B; SUH, N. Chemoprevention an essential approach to controlling cancer. **Nat. Rev. Cancer.**, v.2, n.1, p.537-543, 2002.

SPORN, M.B; LIBY, K.T. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v.2, n.1, p.518-525, 2005.

STONER, G.D; MORSE, M.A; KELLOFF, G.J. Perspectives in cancer chemoprevention. **Env. Health Persp.**, v. 105, n.4, p.945-954, 1997.

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

SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat. Rev. Cancer.**, v.10, n.1, p.768–780, 2003.

SUZUKI, D.E. et al. Inhibition of NF-kappaB and Akt pathways by an antibody-avidin fusion protein sensitizes malignant B-cells to cisplatin-induced apoptosis. **Jour. Oncol.**, v.36, n.5, p.1299-1307, 2010.

TANAKA, T. et al. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. **Carcin.**, v.18, n.5, p.957-965, 1997.

TANG,N. et al. Green tea, black tea consumption and risk of lung cancer: a meta-analysis. **Lung Cancer.**, v.65, n.3, p.274–283, 2009.

TIRKEY, N. et al. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. **BMC Pharm.**, v.5, n.2, p.1-8, 2005.

TRICHOPOULOU, A. et al. Mediterranean diet in relation to body mass index and waist-to-hip ratio: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.82, n.5, p.935-940, 2005.

UMEGAKI, K. et al. Lack of influence of a long-term high or low vitamin E diet on oxidative DNA damage in the bone marrow of mice. **Inter. J. Vit. Nutr. Res.**, v.67, p.149-154, 1997.

VINEIS, A.M.P. et al. Tobacco and cancer: Recent Epidemiological Evidence. **Jour. Nat. Cancer Inst.**, v.96, n.2, 2004.

WANG, D; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat. Rev.**, v.4, n.1, p.307-320, 2005.

WANG, C. et al. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. **Ag. Cell.**, v.8, n.3, p.311-323, 2009.

WATERS, M. D. et al. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutat. Res.**, v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990.

WATTENBERG. L,W. An Overview of Chemoprevention: current status and future prospects. **Exp. Biol. Med.**, v.216, n.2, p.133-141, 1997.

World Health Organization. international consultation on tobacco and youth: what in the world works? Disponível em: http://www.who.int/tobacco/dy_speeches7/en/ Acesso em: 15jan,2013.

WOZNIAK, K. et al, Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **Chem. Biol. Interact.**, v.147, n.1, p.309-318, 2004.

WRCF – World Câncer Research Fund. Disponível em <<http://wcrf-uj.org>>. Acesso: 15jan, 2013.

YANG, C. S., et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu. Rev. Nutr.** v. 21, p. 381-406, 2001.

YAMADA, M. et al. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.70, n.6, p.1386-1394, 2006.

YAO, L.H. et al. Flavonoids in Food and their health benefits. **Plant Food Hum. Nutr.**, v.59, n.3, p.113-122, 2004.

YAREMA, K. J.; LIPPARD, S. J; ESSIGMANN, J. M. Mutagenic and genotoxic effects of DNA adducts formed by the anticancer drug cis-iamminedichloroplatinum(II). **Nucleic. Acids. Res.**, v. 23 n.1, p. 4066–4072, 1995.

YEH M.H. et al. Hesperidin inhibited acetaldehyde - induced matrix metalloproteinase-9 gene expression in human hepatocellular carcinoma cells. **Toxic. Letters.**, v.184, n.3, p.204-210, 2009.

ZHANG J. et al. Inhibition of lipid oxidation by phenolic antioxidants in relation to their physicochemical properties. **Pharmacolog.**, v.1, n.1, p.180–189, 2007.

**ANEXO A – Certificado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética no
Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo
(CEUA/UFES)**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 001/2012, relativo ao projeto de pesquisa intitulado: **"Efeitos quimioprotetivos do flavonóide Hesperidina contra genotoxicidade induzida por Cisplatina em medula óssea de camundongos"**, que tem como responsável o (a) docente **Maria do Carmo Pimentel Batitucci**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 13/04/2012.

Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES

Vitória (ES), 17 de abril de 2012.

APÊNDICE A- Preparação citológica das lâminas de células de medula óssea de camundongos



Figura 1: Preparação citológica das células de medula óssea de camundongo para o teste de micronúcleo. (A) tratamento via gavagem (B) Incisão para a retirada do fêmur. (C) Fêmures extraídos de um camundongo. (D) Coleta da medula óssea em tubo falcon com auxílio de uma seringa preenchida com soro bovino fetal. (E) Centrifugação da medula (F) Ressuspensão do material após o descarte do sobrenadante (G) Esfregaço sanguíneo na confecção das lâminas. Fonte: Arquivo Pessoal.

APENDICE B – Coloração e fixação das lâminas



Figura 1: Coloração das lâminas com Leishman (B). Fixação das lâminas com Metanol (A). Fonte: Arquivo pessoal.

APÊNDICE C – Fotomicrografia

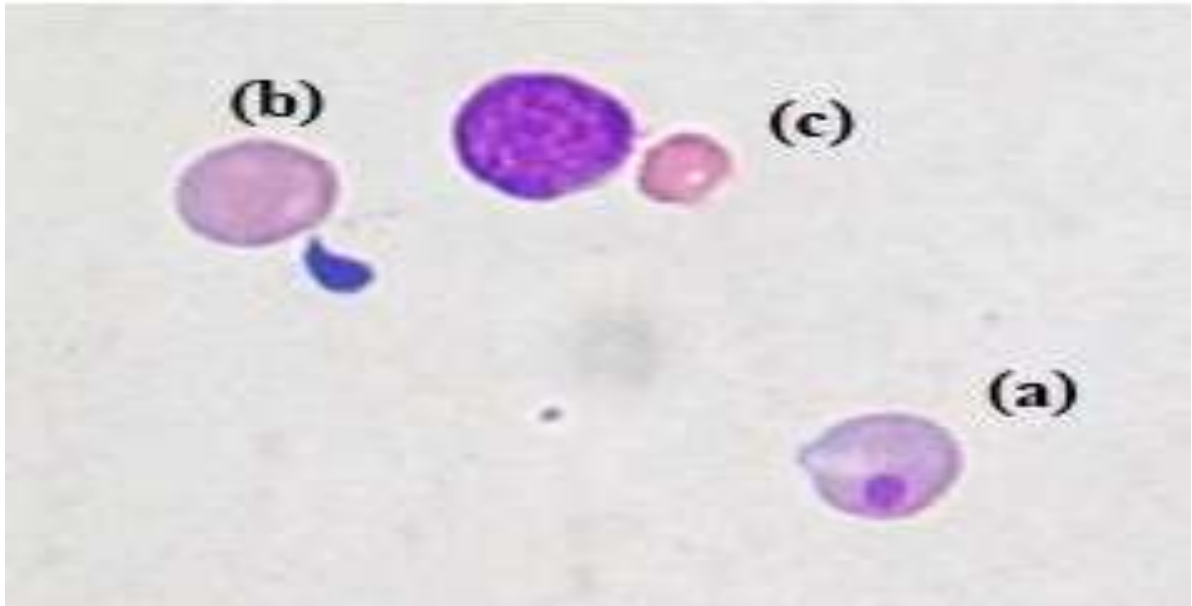


Figura 1: Fotomicrografia mostrando a diferença entre a coloração de eritrócitos policromáticos (PCE), normocromáticos (NCE) e micronucleados (MNPCE). **(a)** eritrócito micronucleado (MNPCE); **(b)** eritrócito policromático (PCE) e **(c)** eritrócito normocromático.

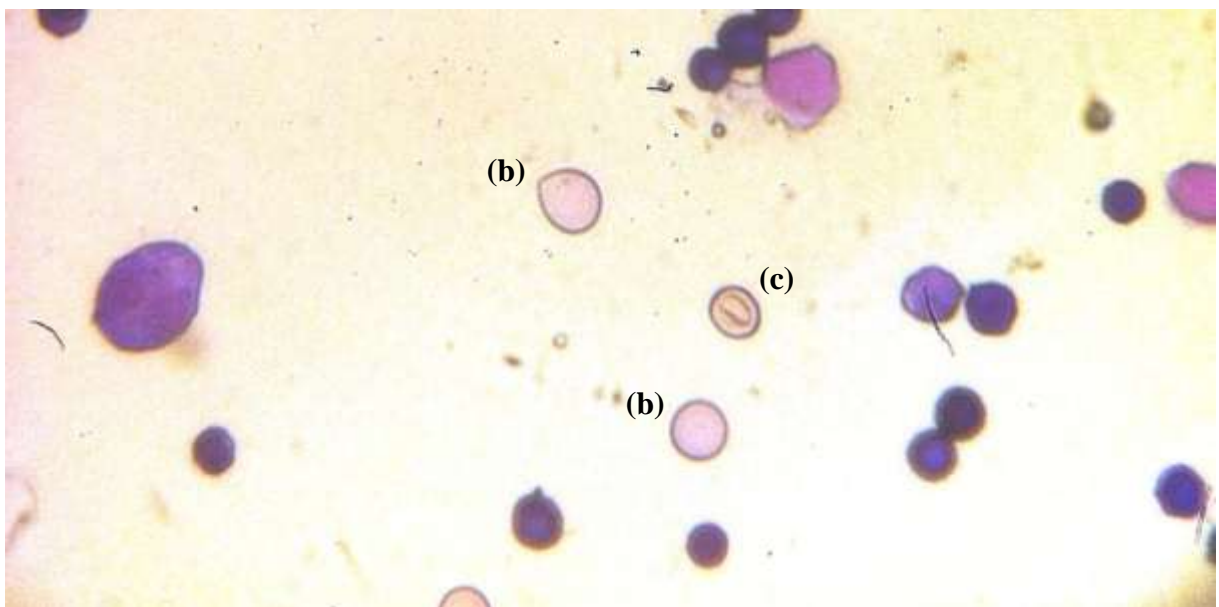


Figura 2: Fotomicrografia demonstrando a diferença na coloração de PCE (b) e NCE (c). **(b)** eritrócito policromático (PCE); **(c)** eritrócito normocromático (NCE). Fonte: Arquivo pessoal.

Nenhuma entrada de sumário foi encontrada.

