

BEATRIZ URSINOS CATELAN SCHNEIDER

**CARDANOL: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA E SEUS EFEITOS  
ANTIGENOTÓXICO, ANTIMUTAGÊNICO E ANTIAPOPTÓTICO  
QUANDO ASSOCIADO À CICLOFOSFAMIDA.**

CAMPO GRANDE

2014

BEATRIZ URSINOS CATELAN SCHNEIDER

**CARDANOL: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA E SEUS EFEITOS  
ANTIGENOTÓXICO, ANTIMUTAGÊNICO E ANTIAPOPTÓTICO  
QUANDO ASSOCIADO À CICLOFOSFAMIDA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE

2014

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

BEATRIZ URSINOS CATELAN SCHNEIDER

**CARDANOL: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA E SEUS EFEITOS  
ANTIGENOTÓXICO, ANTIMUTAGÊNICO E ANTIAPOPTÓTICO  
QUANDO ASSOCIADO À CICLOFOSFAMIDA.**

Resultado: \_\_\_\_\_

Campo Grande (MS), \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Renata Matuo

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

---

Prof. Dr. Fabrício Garmus Sousa

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos meus familiares principalmente aos meus pais, **JOSÉ E ELIZABETH**, meus irmãos, **BRUNO E MARCEL**; e ao meu companheiro e amado marido **LUCIANO**. Dedico também a todos meus amigos que torceram e ainda sei que torcem por mim, e a todas as pessoas que passaram pela minha vida mesmo que por tempo determinado. Tenho certeza que todos são e continuam sendo as peças essenciais para montar o meu “jogo da vida”, como quebra cabeças que ao unirem-se trazem o sentido para cada mínimo episódio de minha existência.

# AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, Senhor de pureza, de paz e de amor.

“Pois estou convencido de que nem morte nem vida, nem anjos nem demônios, nem o presente nem o futuro, nem quaisquer poderes, nem altura nem profundidade, nem qualquer outra coisa na criação será capaz de nos separar do amor de Deus que está em Cristo Jesus, nosso Senhor”

Romanos 8:38-39

**AGRADEÇO** imensamente aos meus pais, por sempre terem me proporcionado o que de melhor tenho nesta vida, o carácter, o bom exemplo de vocês sempre foi um espelho. **VOCÊS** me ensinaram a essência do que sou hoje e o que planejo para meus filhos e netos. Vocês são meu alicerce, meu TUDO... **AMO VOCÊS!**

**Aos meus irmãos queridos**, por sempre cuidarem de mim. Em especial ao meu bebê “Barcelzinho”, que nos deu um baita susto, mas com muita garra lutou pela vida e venceu uma grande batalha para continuar na vida terrena conosco e nos trazer muitas alegrias, muito obrigada meu Maninho caçula. Você muito nos motivou e nos trouxe vários ensinamentos, os quais com certeza foram necessários para cada vez mais melhorarmos e evoluirmos perante Deus.

**AO MEU QUERIDO MARIDO, QUE TANTO AMO, LÚ...** Obrigada meu amor por todo apoio, carinho, compreensão... Sei que muitas vezes não deve ter sido fácil para você, mas nunca se esqueça de que sem seu apoio eu nunca teria chegado aonde cheguei! Obrigada meu lindo, **NUNCA** se esqueça: Eu te Amo Demais !!!

**AO MEU SOGRO VALTER E SOGRINHA MERCEDES**, vocês são meus pais de Campo Grande, pois sempre me acolheram, apoiaram e icentivaram. **OBRIGADA** por tudo. Amo vocês.

**ÀS MINHAS CUNHADAS LARISSA E PAULA**, mesmo morando longe sei que sempre torceram por mim. Vocês são muito especiais para mim!

**À MINHA COMPANHEIRA DE LABORATÓRIO, AMIGA, QUASE IRMÃ, PAMELA** . Amiga, obrigada pelo apoio, pelos dias e diversas noites a fora de estudos... pela companhia nos sushis que tanto amamos! Muito obrigada pelo apoio e muitas vezes ombro amigo..Você mora no meu coração!!!

**ÀS MENINAS DO LABORATÓRIO: NATH, STE E MAIRA**, agradeço a ajuda de todas em meus experimentos e pelos dias divertidos que passamos no biocapri.

**ÀS MINHAS AMIGAS DO CLUBINHO: KEYLLA, KAREN, MEL, ANA PAULA E ANA CARLA** , sei que sempre torceram pela minha vitória ... Agradeço também pelos dias de descontração, pelos conselhos, pelas comilanças em casa... Vocês foram e são essências em minha vida!

**À CAROLZINHA**, amiga de Dourados, obrigada pelos dias de conversas, caminhadas e momentos de distrações que passamos juntas. Desde que iniciamos nossa amizade de adolescência, a qual foi fortalecida dia a dia, só tenho a agradecer pela confiança que sempre depositou em mim. Obrigada Carol! Você é muito especial!

**À EDINEUZA**, pelas doações.

**AO ALISSON** pela ampla contribuição em meu trabalho.

**AO MEU ORIENTADOR RODRIGO!** Agradeço de coração a oportunidade. Obrigada, aprendi muito com você.

**A CAPES E A FUNDECT**, pelo auxílio financeiro concedido.

“ QUANTOS ESTAMOS PRESOS  
A GRILHÕES INVISÍVEIS?  
ESSE ESTÁ PRESO AO CAMPO  
QUE COMPROU POR MILHÕES  
OUTRO PRENDEU-SE À FAMA  
QUE LHE CONSOME A VIDA.  
AQUELE LEMBRA UM LOUCO  
EM ALGEMAS DE OURO.  
HÁ QUEM FAÇA DO AMOR  
UM CATIVEIRO EM TREVAS.  
SE QUERES PAZ EM DEUS,  
DESAPEGA-TE E AMA.”

(EMMANUEL: SÃO FRANCISCO DE ASSIS)

## RESUMO

SCHNEIDER, Beatriz Ursinos Catelan. Avaliação toxicológica do cardanol saturado, in vivo, como possível facilitador em alvos terapêuticos nas terapias antineoplásicas. 2014. 60p. Dissertação (Mestrado Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Em função da provável atividade antioxidante do cardanol o mesmo possui indicativo para testes na área de genética toxicológica e carcinogênese. Por isso avaliou-se a genotoxicidade, a mutagenicidade, o potencial imunomodulatório, quimiopreventivo e apoptótico do cardanol de cadeia lateral saturada (2,5, 5 e 10mg/Kg), isolado e em associação com a ciclofosfamida (100mg/Kg), em camundongos Swiss. Os resultados indicaram que o cardanol é genotóxico e mutagênico para a menor e a maior doses testadas, respectivamente; e não estimula fagocitose esplênica e nem apoptose. Já quando associado com a ciclofosfamida apresenta atividade antígeno-tóxica, antimutagênica, sendo essa mais expressiva, e antiapoptótica. Destaca-se ainda que o cardanol associado e/ou isolado possui baixa atividade imunomodulatória. Assim, considera-se que o cardanol não deve ser usado em associação com o quimioterápico ciclofosfamida e em especial como um coadjuvante quimioterápico. No entanto, pela sua baixa toxicidade, a relação risco/benefício, sugere o seu uso como quimiopreventivo o que demonstram potencial terapêutico.

Palavras-chave: lipídeo fenólico, quimioterapia, micronúcleo, ensaio do cometa, apoptose



## ABSTRACT

According to the possible antioxidant activity of cardanol about same indication for testing in the field of genetic toxicology and carcinogenesis. Therefore we evaluated the genotoxicity, mutagenicity, the immunomodulatory potential chemopreventive and apoptotic saturated cardanol side chain (2,5, 5 and 10mg/kg), alone and in combination with cyclophosphamide (100mg/kg) in Swiss mice. The results indicated that the cardanol is genotoxic and mutagenic for the lowest and the highest doses tested respectively; and does not stimulate phagocytosis and splenic or apoptosis. However, when associated with cyclophosphamide has antigenotoxic activity, antimutagenic, this being more expressive, and antiapoptotic. Note also that the cardanol associated and / or has low immunomodulatory activity isolated. Thus, it is considered that the cardanol should not be used in association with chemotherapy cyclophosphamide and in particular as a chemotherapeutic adjuvant. However, its low toxicity, suggests its use as a chemopreventive, risk / benefit ratio, demonstrating the therapeutic potential.

Palavras-chave em inglês: phenolic lipids, chemotherapy, micronucleus, comet assay, apoptosis.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Grupos experimentais e dosagem dos compostos .....	40
<b>Tabela 02.</b> Dados biométricos dos grupos experimentais expostos ao cardanol:.....	54
<b>Tabela 03.</b> Peso relativo dos órgãos após período de experimentação: .....	55
<b>Tabela 04.</b> Frequência de células com danos no dna, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de (anti) genotoxicidade do cardanol no ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos:.....	56
<b>Tabela 05.</b> Frequência de micronúcleo em sangue periférico de camundongos: .....	57
<b>Tabela 06.</b> Número total, frequência média $\pm$ erro padrão da média (epm) e porcentagem de células com ou sem evidência de fagocitose esplênica em camundongos:.....	58
<b>Tabela 07.</b> Avaliação da apoptose em fígado, rins e baço de camundongos: .....	59
<b>Tabela 08.</b> Contagem diferencial de células do sangue periférico em camundongos: .....	60

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Estrutura química dos lipídios fenólicos obtidos do lcc (líquido das cascas da castanha de caju) ..... 17
- Figura 02.** Hidrogenação catalítica da mistura de cardanóis.....39

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Considerações iniciais a respeito do câncer.....	13
1.2 Mutagenicidade x antimutagenicidade.....	13
1.3 Aspectos da atividade antioxidante .....	15
1.4 Líquido das cascas da castanha de caju (LCC) e seus componentes.....	16
1.5 Lipídeos fenólicos e principais atividades .....	17
1.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	18
1.6.1 Ensaio do cometa.....	18
1.6.2 Ensaio do micronúcleo em sangue periférico.....	20
1.6.3 Ensaio de fagocitose esplênica .....	21
1.6.4 Ensaio de apoptose.....	22
1.6.5 Contagem diferencial de células do sangue.....	22
1.7 Referências.....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos .....	33
<b>3. ARTIGO</b> .....	34
<b>4. ANEXOS</b> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

### **1.1 Considerações iniciais a respeito do câncer**

O Câncer é o conjunto de doenças caracterizadas pela propagação descontrolada de células anormais. Esta enfermidade é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (BRASIL, 2011; INCA, 2014). A organização mundial da Saúde (OMS) estima que em 2030 haja 21,4 milhões de casos incidentes de câncer, 13,2 milhões de mortes pela doença e 75 milhões de pessoas vivas portadoras de alguma neoplasia maligna. Assim como dados do Instituto Nacional do Câncer (2014) já estimam que para o ano de 2014 e 2015 haverá a ocorrência de cerca de 580 mil novos casos de câncer no país. O câncer é uma doença multifatorial causada por tanto por mecanismos exógenos, quanto endógenos. Entre as causas exógenas destacam-se os hábitos próprios de cada indivíduo e o ambiente sócio-cultural em que vivem. Já as endógenas, podem ser determinadas por causas genéticas pré-determinadas, como é o caso de defeitos em genes supressores tumorais ou ativação de oncogenes (WUNSCH-FILHO & ZAGO, 2005).

Diante deste fato, muitos estudos têm sido desenvolvidos no sentido da prevenção, em especial sobre o impacto ocasionado no material genético e consequentemente a relação com doenças, como é o caso das neoplasias (REIFFERSCHIED E HEIL, 1996; DE FLORA E FERGUSON, 2005), tendo como foco principal a quimioprevenção. Sendo a quimioprevenção definida como o uso de agentes químicos naturais ou sintéticos visando reverter, suprimir ou prevenir a progressão carcinogênica (BRETANI; COELHO; KOWALSKI, 2003). O que por sua vez, pode ocorrer através da ação de substâncias com atividade protetora do DNA (FERGUSON, 1994).

### **1.2 Mutagenicidade X Antimutagenicidade**

As elevadas taxas de tumores desenvolvidos nas populações devido exposição a agentes mutagênicos, efetivos em causar danos ao material genético, é uma grande preocupação no mundo inteiro (BRASIL, 2014). Assim como substâncias que promovam proteção do material genético (OLIVEIRA et al., 2006). Por isso a constante pesquisa por agentes que possam reduzir a frequência de mutações no DNA é promissora, através de estudos que demonstrem a

possibilidade de redução de danos genéticos e a minimização da toxicidade dos agentes antineoplásicos utilizados em protocolos clínicos.

As populações expostas a agentes genotóxicos conhecidos demonstram que há diferenças interindividuais em relação ao dano ocasionado ao DNA. A possível explicação para tal fato se dá pela existência de polimorfismos em genes envolvidos nos processos de reparo de dano de DNA, cujas proteínas codificadas têm a função de reparar mutações e proteger contra o aumento da instabilidade cromossômica (BUTKIEWICZ et al., 2001). Tais agentes estão relacionados com o desenvolvimento de câncer como resultados de alterações em genes que controlam a proliferação e a diferenciação celular (protooncogenes e genes supressores de tumor), ou de alterações em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA (FEARON; HABER, 1998; BALMAIN; GRAY AND PONDER, 2003).

A formação de neoplasias ocorre devido ao desequilíbrio da proliferação celular (ciclo celular) e a apoptose, pois são eventos controlados por vários genes, que ao sofrerem mutações, poderão levar a expressão produtos anormais, que podem iniciar a formação de um tumor (COOPER; HAUSMAN, 2009). A iniciação, promoção, progressão e manifestação, são etapas responsáveis pelo processo de carcinogênese (PITOT, 1989). A iniciação é causada por uma alteração irreversível do DNA, como a reação dessa molécula com substâncias carcinogênicas. Esta fase pode ser provocada através da ação direta do carcinógeno ou dependente da ação do mesmo, com a conseqüente formação de metabólitos ativos que interagem com o DNA, levando à sua mutação (MILLER & MILLER, 1981; CLAYSON, 1985; PARKE, 1987). A promoção é caracterizada pela formação de lesões benignas, com alterações fenotípicas. Em geral, os agentes promotores não reagem diretamente com o material genético da célula (PITOT & DRAGAN, 1991; PITOT, 1993). As etapas a seguir são caracterizadas primeiramente pela instabilidade cariotípica através de alterações no genoma, chamada então de progressão, revelando a manifestação histológica do genoma (PITOT, 1993). A última etapa, a de manifestação, intimamente relacionada às anteriores, é caracterizada pelo poder de invasão as células vizinhas assim como variadas alterações bioquímicas (PITOT, 1989).

O Potencial antimutagênico de uma substância é caracterizado pela capacidade da mesma ocasionar a redução na frequência de mutações, espontâneas ou induzidas (JOHNSON AND HUFF, 2002). Os mecanismos de ação

de agentes antimutagênicos foram classificados em dois processos: Desmutagênese e Bioantimutagênese (GRUTER et al., 1990; WATERS et al., 1990).

A desmutagênese é caracterizada pela capacidade de um composto inativar um agente mutagênico, diretamente, ou seus precursores, enzimática e quimicamente (KADA E SHIMOI, 1990; FERGUSON, 1994). Enquanto que na bioantimutagênese, as substâncias atuam como modeladoras no reparo e replicação do DNA. Atuam a nível celular aumentando com fidelidade a replicação, estimulando o reparo livre de erros, ou inibindo os mecanismos de reparo sujeitos a erros (HARTMAN E SHANKEL, 1990; DE FLORA, 1998; SIMIC et al., 1998).

A utilização de compostos antimutagênicos/ anticarcinogênicos pode ser uma forma de prevenção na formação de tumores e algumas doenças genéticas, a este processo dá-se o nome de quimioprevenção (GOMES et al., 1996). A quimioprevenção é testada quando se utiliza um composto com potencial mutagênico em confronto com agentes químicos naturais ou sintéticos, com possível ação antimutagênica, e este deve ocasionar redução de danos no DNA, ou seja, ação protetora contra a carcinogênese através da transformação de lesões pré-malignas em malignas (SPORN, 1976).

### **1.3 Aspectos da Atividade antioxidante**

Agentes antioxidantes são substâncias capazes de proteger as células contra os efeitos produzidos pelos radicais livres e estão associados com a redução do risco de câncer, e por isso são considerados inibidores da carcinogênese (SIES, 1993; KELLOFF, 1999). O oxigênio é vital para a vida, porém esta molécula pode ser parcialmente reduzida, através de diversos processos físicos e químicos, culminando na formação de diversos agentes reativos tais como radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROS) (OGA, 2003). As EROS incluem radicais livres como o radical superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxilas ( $OH^\cdot$ ) e hidroperoxila ( $ROO^\cdot$ ) e também espécies de não radicais livres, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (ARUOMA, 1999; HALLIWEEL E GUTTERIDGE, 2000). Estes radicais livres, quando produzidos, podem ser prejudiciais ao DNA e RNA, oxidar lipídeos e proteínas; assim como as EROS também podem atacar as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídeos e colesterol, retirando um hidrogênio do grupo

metileno bis-aliílico, e desta forma iniciando o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares (WOLFF et al., 1986; STORZ et al., 1987; VALKO et al., 2004).

O estresse oxidativo ocasiona danos em sistemas biológicos acarretando na formação de várias doenças neurológicas, cardíacas, do envelhecimento precoce e o câncer (SMITH et al., 1996; TABATA et al., 2008); este apresenta mecanismos envolvidos no desenvolvimento da carcinogênese, entre eles o epigenético, com modulação de genes responsáveis por sinais de crescimento e proliferação celular (VALCO et al., 2004); e ou outro, através de alterações genéticas induzidas pelos radicais livres, ou seja, em mutações e rearranjos cromossômicos, que podem desempenhar importante papel na etapa de iniciação da carcinogênese (GUYTON; KENSLER, 1993).

As substâncias antioxidantes, mesmo em baixas concentrações, são capazes de inibir as taxas de oxidação (MAXWELL, 1995; SIES, 1999). Os substratos formados a partir de antioxidantes não são reativos na propagação da reação em cadeia, por isso são neutralizados pela reação com outro radical, formando produtos estáveis ou que possam ser reciclados por outros antioxidantes (ATOUI et al., 2005). Estas substâncias ou substratos, podem atuar através de 3 maneiras: (I) Prevenção, caracterizada pela prevenção da geração de radicais livres; (II) interceptação de radicais livres; (MAXWELL, 1995; SIES, 1999; KONG E LILLEHEI, 1998; SANTOS & CRUZ, 2001) e (III) na detoxificação de sub produtos advindos da oxidação, pela ação de enzimas de reparo de DNA (PETERMAN et al., 2009).

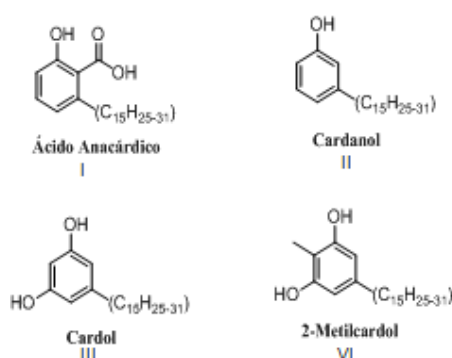
#### **1.4 Líquido das cascas da castanha de caju (LCC) e seus componentes**

O cajueiro, espécie *Anacardium occidentale* L., faz parte da família Anacardeae, é uma planta abundante com ramificação baixa e possui porte médio (LORENZI, 1992). Está presente em todos os estados, porém a região Nordeste é que melhor se adapta (ARAÚJO E SILVA, 1995). As partes desta planta, tais como o tronco, as folhas, o pseudofruto, a castanha e o líquido das cascas da castanha de caju (LCC), são amplamente aplicados na indústria alimentícia, metalúrgica, setor industrial, bem como na etnofarmacologia (MITCHELL, 1987; FERRÃO, 2005). O fruto, na verdade é denominado pseudofruto, pois o verdadeiro fruto é a castanha que fica afixada ao pedúnculo o qual é consumido *in natura*, enquanto que a castanha para ser consumida, deve ser torrada, devido a presença de ácido; das cascas



da castanha, é extraído um óleo resinoso e caústico ( LCC) de colocação escura (LORENZI, 1992).

O LCC, conhecido internacionalmente por CNSL (cashew nutshell liquid) (MOTHÉ & MILFONT JR, 1994), é um líquido castanho escuro, viscoso, acre e cáustico, constitui uma fonte natural de compostos fenólicos já conhecidos: anacárdicos, cardóis, cardanóis e 2-metilcardóis (figura 01), os quais apresentam uma cadeia lateral alifática longa, com até quinze carbonos na posição meta em relação à hidroxila, contendo de zero a três insaturações localizadas em C-8' (monoeno), C-8' e C-11' (dieno) e C-8', C-11' e C-14' (trieno) (TYMAN et al., 1989; KUBO et al., 1986; SHOBBA et al., 1992). A composição do LCC pode variar de acordo com a origem e com o processo de extração (GEDAM & SAMPATHKUMARAN, 1986). Quando a extração é realizada em temperaturas entre 180-200 °C, de forma industrial, resulta na descarboxilação do ácido anacárdico, originando o cardanol (TYCHOPOULOS & TYMAN, 1990).



**Figura 01.** Estrutura química dos lipídios fenólicos obtidos do LCC (Líquido das Cascas da Castanha de caju)

Estruturas que compõem o LCC estão indicadas por I, II, III e VI.

### 1.5 Lipídeos Fenólicos e principais atividades

Os compostos químicos derivados do fenol formados por longas cadeias de carbono são chamados de lipídeos fenólicos não isoprenóides, devido a presença de porções lipofílicas e porções hidrofílicas (KOZUBEK e TYMAN, 1999; HERTWECK, 2009). Estas são responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas em processos celulares, como mutagênese e citotoxicidade, mediante interações com ácidos nucleicos, proteínas e enzimas. Assim como distúrbios em microrganismos,

pela interação com algumas moléculas importantes em nível de membrana celular (KOZUBEK e TYMAN, 1999; STASIUK e KOZUBEK, 2010).

Os fenóis naturais e seus derivados podem ser encontrados em plantas e organismos marinhos e são amplamente difundidos na terra e tem sido isolados e caracterizados. Nesta classe de compostos incluem os flavonoides, as lignanas e os cardanóis (TYMAN, 1996). Os componentes do LCC são reconhecidos por apresentarem atividades antibacterianas (MORAIS et al., 1990; HIMEJIMA; KUBO et al., 1993); antifúngicas (ADAWADKAR AND SOHLY, 1982); antioxidantes (AMORATI et al., 2001), antitumorais (ITAKOWA, et al., 1989; CHEN et al., 1998).

O ácido anacárdico (AA), principal componente do LCC, foi estudado por diversos autores, os quais constataram ação antibacteriana, através de testes com *H.pylori* em bactérias gram negativas, com *S.aureus* comparando a estrutura ativa do A.A na bactéria e o consequente sinergismo entre ambos (KUBO; LEE E KUBO., 1999; KUBO; NIHEI E TSUJIMOTO., 2003; MUROI et al., 2004). A sua atividade antioxidante foi relatada por Negabhushana et al (2002) através da quelação dos íons  $Fe^{+2}$  e  $Cu^{+2}$ . O AA apresentou citotoxicidade moderada em experimento *in vitro* (KUBO; NIHEI E TSUJIMOTO, 2003), assim como citotoxicidade e genotoxicidade *in vivo* (ACEZEDO et al., 2006), mas não atividade mutagênica quando administrado oralmente em camundongos (CARVALHO et al., 2011).

Além disso, Kubo et al., (2011) relataram que o cardol isolado a partir de *Anacardium occidentale* foi moderadamente citotóxico em células de melanoma. Lee et al, (1998), relataram que o cardanol isolado a partir do *Ginkgo biloba* exibiu efeitos inibitórios contra a PI-PLC $\gamma$ 1 e foi citotóxico perante células oncológicas *in vitro*, com excessão das normais de colón; já Teerasripreecha et al (2012), demonstrou em experimento *in vitro* com linhagens celulares oncológicas, que os compostos cardol e cardanol apresentaram atividade antiproliferativa e citotóxica.

Assim, neste trabalho foi realizado estudo do cardanol isolado a partir do LCC técnico, no intuito de avaliar a forma de ação deste lipídeo fenólico frente ao quimioterápico ciclofosfamida, em camundongos *swiss*.

## **1.6 Ensaios Biológicos**

### 1.6.1 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa é um teste utilizado para identificar a ocorrência de danos genotóxicos quando um sistema, *in vivo* ou *in vitro*, é exposto a um agente

tóxico (SAVVA, 2000). Esta metodologia visa evidenciar a migração de fragmentos de DNA, em relação ao nucleóide principal, quando este é submetido a uma corrente eletroforética. As células com danos formam figuras semelhantes a cometas. Ryndenberg & Johanson (1978) foram os primeiros pesquisadores a utilizar a quantificação direta do DNA em células individuais; Östling & Johanson (1984), incluíram neste teste a eletroforese em pH semineutro (pH 9,5), proporcionando maior sensibilidade do teste (TICE, 1995).

Singh et al. (1988), introduziu a eletroforese em pH alcalino (pH > 13) e transformou o ensaio do cometa em uma técnica de grande importância na detecção de quebras no DNA e de danos em sítios álcili-lábies, *in vivo* e *in vitro*. Por isso, esta técnica é descrita como um método rápido, simples e sensível, muito utilizado para quantificar danos genéticos em um pequeno número de células. A técnica é importante, principalmente na detecção de diferenças intercelulares, quanto aos danos ao DNA e no reparo, em praticamente qualquer célula eucariótica onde seja possível obter uma suspensão celular, mesmo em uma amostragem pequena. Além disso, os resultados podem ser obtidos em um dia e o custo para realiza-la é reduzido. A sensibilidade do ensaio cometa em detectar danos em células individuais pode se equiparar a outros métodos que avaliam danos em uma população de células (OLIVE et al., 1992; FAIRBAIRN et al., 1995; RIBAS, 1995; ROSS et al., 1995; TICE, 1995; KLAUDE et al., 1996; ANDERSON et al., 1998; TICE et al., 2000; FRIEAUFF et al., 2001).

O ensaio é realizado por meio da deposição de células em lâminas pré-recobertas com agarose, seguida de lise, desnaturação do DNA e eletroforese em pH alcalino (pH > 13). Após, as lâminas são neutralizadas, fixadas e coradas com um agente intercalante para posterior análise dos cometas a partir do DNA fragmentado em microscopia de fluorescência. Por se tratar de um teste muito aplicado, as técnicas de isolamento celular e as condições do experimento podem sofrer variações, e por isso a sensibilidade do teste pode ser reduzida, tais condições como a natureza química e o mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração e quantidade de agarose de baixo ponto de fusão, composição da solução de lise, tempo de lise, tempo de desnaturação alcalina do DNA, composição e temperatura do tampão de eletroforese, as condições de corrida, a coloração do DNA entre outros (OLIVE et al., 1992; SPEIT e HARTMANN, 1999).

Os cometas gerados por esta técnica podem ser analisados em microscópio de fluorescência, utilizando-se agentes intercalantes de DNA tal como o brometo de etídio, DAPI, SYBR green (KOBAYASHI, 1995). Eles são classificados por análise visual em: classe 0 – nucleóides sem danos e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 – nucleóides com cauda de tamanho ente 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide. Nucleóides de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados geralmente não são contabilizados (SPEIT et al., 1996).

#### 1.6.2 Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

Hayashi et al., (1990) descreveram a técnica de micronúcleo em sangue periférico utilizando a coloração com Laranja de Acridina, corante que intercala-se com moléculas de DNA e que após sofrer exposição à radiação ultravioleta emite uma fluorescência de cor amarela. Entretanto, quando o mesmo se liga ao RNA, sem a capacidade de se intercalar, a fluorescência emitida é vermelha. Tais propriedades permitem a identificação dos reticulócitos, eritrócitos jovens ricos em RNA em nível citoplasmático, que se coram em vermelho devido presença desse ácido nucléico. Já os micronúcleos que possuem DNA em sua constituição coram-se em amarelo e podem ser localizados no meio ou nas bordas das regiões coradas em vermelho.

Os Micronúcleos, de acordo com Tucker & Preston (1996), são utilizados para quantificar a exposição a agentes químicos ou físicos; e por se tratar de um procedimento importante é amplamente utilizado em pesquisas toxicogenéticas para avaliação da capacidade cancerígena de um composto (KRISHNA e HAYASHI, 2000).

Kishi et al., (1992) demonstram em estudos comparativos entre a técnica convencional, em medula óssea, corada por Giemsa, e a técnica que utiliza pré-coloração com Laranja de Acridina, uma boa correlação, reforçando que todas as técnicas mostram-se adequadas para este tipo de avaliação. Porém, a técnica de sangue periférico apresenta a vantagem de que um mesmo animal poderá fornecer várias amostras de material, sem a necessidade de eutanásia do mesmo (CSGMT, 1992). Isto permite avaliar o perfil da frequência de micronúcleos em um mesmo

animal ao longo de um tratamento agudo, subcrônico e crônico; possibilitando assim, o estudo da recuperação deste mesmo indivíduo, após a suspensão das administrações das drogas-teste (OLIVEIRA, 2009).

### 1.6.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica

O baço, segundo Groom, Schmidt e Macdonald (1991) é um órgão dividido em compartimentos compostos por trabéculas de tecido conjuntivo, a partir da cápsula. A região medular do parênquima apresenta três áreas: polpa vermelha, polpa branca e zona marginal. A polpa vermelha é formada pelos seios esplênicos (sinusóides) entre os quais se situam os cordões de Billroth e dos plexos sanguíneos. Nesta região encontram-se predominantemente macrófagos, hemácias e plaquetas. A polpa branca é formada por nódulos linfáticos; enquanto que as bainhas em torno das arteríolas, se apresentam como zonas branco-acinzentadas difusas na polpa vermelha, onde são encontrados predominantemente linfócitos. A zona marginal situa-se na periferia da zona branca e contém as artérias marginais

O baço é um órgão responsável pela fagocitose; da qual sua ocorrência ou não depende de três processos seletivos: (I) superfície dos tecidos, quanto maior rugosidade maior probabilidade de fagocitose; (II) da presença ou não de proteínas protetoras, que repelem os fagócitos, no caso dos tecidos necrosados e partículas estranhas não há esta proteção; e (III) da ativação do sistema imunológico (cascata do complemento), em que o C3 liga-se na membrana do fagócito, iniciando assim a fagocitose (GUYTON e HALL, 2000). Acredita-se que as células ao entrarem em fagocitose por um destes meios citados, bem como após sofrerem lise celular, fazem com que a fagocitose esplênica também seja efetiva na retirada de células anucleadas e/ou micronucleadas bem como àquelas que tiveram lesão de membranas (BOATRIGT e SALVASEN, 2003).

Cerca de 1,2% de todas as hemácias do organismo são removidas diariamente pelos fagócitos, sendo 50% dessa remoção feita pelo baço. Este órgão também é considerado um dos principais órgãos do sistema imunológico, pois as células esplênicas capturam antígenos e os apresentam aos linfócitos T e B, que irão interagir e estimular a geração de plasmócitos secretores de anticorpos; assim como uma importante fonte de células hematopoiéticas, especialmente em casos de anemia grave. Além de ser responsável pelo seqüestro de elementos do sangue, em

humanos, o baço contém de 30 a 40% das plaquetas do corpo; 80 a 90% da massa total das plaquetas, as quais quando isoladas nos interstícios da polpa vermelha do baço, podem ocasionar plaquetopenia. Da mesma maneira que o baço pode seqüestrar leucócitos apresentando quadro de leucopenia (MEBIUS e KRAAL, 2005).

#### 1.6.4 Ensaio de apoptose

O processo natural de morte celular programada foi descrito pela primeira vez por Walther Flemming (1885); e este foi denominado de apoptose por Kerr (1972). Raff (1992) descreveu morfológicamente a diferença entre morte celular e necrose; assim este foi caracterizado pela clivagem da cromatina e colapso nuclear, pela condensação do citoplasma e pelas mudanças na membrana plasmática e ausência de inflamação.

A morte celular programada é uma forma fisiológica responsável pelo balanceamento da proliferação celular e manutenção das células que sofrem constantemente renovação celular, funciona também como um mecanismo de defesa por meio do qual células lesadas ou potencialmente perigosas podem ser eliminadas para o bem do organismo como um todo.

A utilização de métodos confiáveis e reprodutíveis para identificar e quantificar a apoptose é uma condição essencial na diferenciação da apoptose em grupos sinalizados (MAURO, 2011). Assim, a técnica de Rovozzo (1973), adaptada por Mauro et al. (2011), foi novamente readaptada por Navarro et al., (2014) para utilização em experimentos *in vivo* a fim de identificar células apoptóticas por meio de análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear, a partir de coloração com Alaranjado de Acridina, foi utilizada neste ensaio.

#### 1.6.5 Contagem diferencial de células do sangue

O sistema hematopoiético é um processo pelo qual novas células mieloides e linfoides, as quais serão formadas de forma dinâmica através de um sistema complexo (MORRISON, UCHIDA e WEISSMAN, 1995), em presença de citocinas (AKASHI et al., 2000). A diferenciação das células- tronco hematopoiéticas por um dos dois caminhos, linfóide e mielóide, dá origem a células T, B e NK ou monócitos, granulócitos, eritrócitos e plaquetas (ABKOWITZ et al., 2000; AKASHI, 2005). Os

leucócitos, células brancas, desempenham importante função na defesa do organismo, pois cada subtipo possui funções específicas; tais como os neutrófilos, granulócitos que participam da fagocitose, destruição de bactérias e fungos, assim como da reação inflamatória aguda (VELDERS e FIBBE, 2005); os eosinófilos, os quais realizam a mediação de processos inflamatórios associados à alergia, defesa contra verminoses e alguns distúrbios cutâneos e neoplásicos (SANDERSON, 1992). Os basófilos são células efetoras das reações de hipersensibilidade imediata (GALLI, 1993); enquanto que os monócitos atuam nos tecidos e participam da fagocitose de células senescentes ou mortas e de corpos estranhos (SUZUKI et al., 2004).

Os leucócitos são responsáveis pela resposta imunológica de organismos; a imunidade humoral ligada à produção de anticorpos (linfócitos B) e a imunidade celular ligada à proliferação de células efetoras. A participação dessas células em processos imunes e inflamatórios ocorre através do reconhecimento e destruição de células anormais. (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Em animais roedores, a quantificação dos leucócitos inclui a contagem total e diferencial em torno de  $2$  e  $10 \times 10^3/\text{mm}^3$ . Estes parâmetros podem ser utilizados em diagnósticos como biomarcadores, uma vez que podem sugerir lesões em outros órgãos ou tecidos, dado que as alterações neste perfil podem indicar infestações e infecções ou até mesmo mudanças ambientais (SHAHSAVANI et al., 2010).

A contagem diferencial de células do sangue é um importante teste, e é muito utilizado para a avaliação imunológica. Esta técnica de contagem, pode também auxiliar na compreensão do processo hematopoiético, identificando possíveis doenças hematológicas ou não hematológicas, assim como o tratamento das mesmas (EVANS, 1997). No presente estudo, foi utilizado o Kit panótico para realização deste teste, para auxiliar os dados coletados dos ensaios biológicos anteriormente citados.

### **1.7 Referências**

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Imunologia celular e molecular. 5ª. Ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2005.

ABKOWITZ, J.L.; GOLINELLI, D.; HARRISON, D.E.; GUTTORP, P. In vivo kinetics of murine hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 96, p. 3399-3405, 2000.

ACEVEDO H.R.; ROJAS, M.D.; ARCEO, S.D.; SOTO HERNANDEZ, M.; MARTINEZ VAZQUEZ, M.; TERRAZAS, T.; DEL TORO, G.V. Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. **Mutatation Research**, v.609, 43-46, 2006.

ADAWADKAR P.D. AND EL SOHLY M.A. Fitoterapia, **Chemestry Abstrat** 97. 129, 1981.

ALBREHT, T.; MCKEE, M.; ALEXE, D.M.; COLEMAN, M.P.; MARTIN-MORENO, J.M, Making progress against cancer in Europe in 2008. **Europe Journal of Cancer** 2008; 44: 1451–56.

AKASHI, K. Lineage promiscuity and plasticity in hematopoietic development. *Ann. N.Y. Academy Scienc*, v. 1044, p. 125-131, 2005.

AKASHI, K.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T.; WEISSMAN, I.L. A clonogenic commom myeloid progenitor that give rise to all myeloid lineages. **Nature**, v. 404, p. 193-197, 2000.

AMORATI, R.; PEDULLI, G.F.; VALGIMGLI, L.; ATTANASI, O.A.; FILIPPONE, P.; FIORUCI, C.; SALADINO, R. Absolute rate constants for the reaction of peroxy radicals with cardanol derivatives. **Journal of the Chemistry Society Perkin Transactions 2**, 2142-2146, 2001.

ANDERSON, D.; PLEWA, M. J. The international comet assay workshop. **Mutagenesis**, v. 13, p. 67-73, 1998.

ANDERSON, D.; YU, T. W.; MC-GREGOR, D. B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, v. 13, p. 539-555, 1998.

ARAÚJO, J.P.P. & SILVA, V.V. "CAJUCULTURA: MODERNAS TECNICAS DE PRODUÇÃO". Embrapa/CNPAT: Fortaleza, 1995.

AROUMA, O.I. Antioxidante action of plant foods: One of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. **Free radical Research**, 30, p.419-427, 1999.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSTON, G.; KEFSLAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant and phenolic profile. **Food Chemistry**, 89, p..27-31, 2005.

AZEVEDO, G.,MENDONÇA, S. Câncer na população feminina brasileira, **Revisa Saúde Pública**.27 (1):68-75,1993

BALMAIN, A., GRAY, J., PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. **Nature Genetics**. 33:238, 2003.

BOATRIGT, K.M.;SALVESEN, G.S. Mechanism of caspase activation, **Current Opinion Cellullar Biology**. v.15,p. 725–731, 2003



BOS, J.L.; KREIJL, C.F. Genes and genes products that regulate proliferation: Critical targets in carcinogenesis. IARC. **Science and Public. Sci. Publ.**, n. 116, p. 57-65, 1992.

BUTKIEWICZ, D. et al. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 22, n.4, pp. 593-597, 2001.

CLAYSON, D.B. Dose relationships in experimental carcinogenesis; dependence on multiple factors including biotransformation. **Toxicology Pathology**, v.13: 119-27, 1985.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. A célula: Uma abordagem molecular. 3ed, Porto Alegre: Artmed, 2009.

CHEN, J.; ZHANG, Y. H.; WANG, L. K.; SUCHECK, S. J.; SNOW, A. M. & HECHT, S. M. Inhibitors of DNA polymerase  $\beta$  from *Schoepfia Californica*. Journal Chemical Society, **Chemical Communications**, 24, 2769–2770, 1998.

CSGMT, Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. **Mutation Research**. v. 278, p. 83-98, 1992.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R.; Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**. v. 591, p. 8-15, 2005.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v.402, p. 151-8, 1998.

EVANS, T. Developmental biology of hematopoiesis. **Hematologic Oncology Clinic**. N. Am., v. 11, n. 6, p. 1115-1147, 1997.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**. v. 339, p. 37-59, 1995.

FERGUSON, L.R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Research**. v.307, p.395-410, 1994.

FEARON, E.R.; HABER, D.A. The promise of cancer genetics. *Lancet*. May; 351 **Suppl 2**:S11-8, 1998.

FERRÃO, J.E.M. O cajueiro. Instituto de investigação científica: Lisboa, 2005

FRIEAUFF, W.; HARTMANN, A.; SUTER, W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. **Mutagenesis**, v. 16, n. 2, p. 133-137, 2001.

GALLI, S.J. New concepts about the mast cells. N. **England Journal of Medicine**, v. 328, p. 257-265, 1993.

GEDAM, P.H.; SAMPATHKUMARAN, P.S. Cashew nut shell liquid: extraction, chemistry and applications. **Program Organization Coat** 14: 115-157, 1986

GRUTTER, A.; FRIEDERICH, U.; WURGLER, F.E. Antimutagenic effects of mushrooms. **Mutation Research**. v.231, p.243-249, 1990.

GOMES, E.M.; SOUTOT, P.R.F.; FELZENSZWALB, I.. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. **Mutation Research**, v. 367, p. 203-208, 1996.

GUYTON, K.Z.; KENSLER, T.W. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*, v.49, p.523-544, 1993.

GROOM, A.C.; SCHMIDT, E.E.; MacDONALD, I.C. Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. **Scan Microscopy**., v. 5, p. 159-174, 1991.

GYUTON E HALL. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10 ed, Rio de Janeiro: Guanabara, 2000

HARTMAN, P.E.; SHANKEL D.M. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Environ Molecular Mutagenesis**, v 15, p 145-182, 1990.

HALLIWEEL, B.; GUTTERIDGE, J.C. *Free radicals in Biology and medicine*. 3 ed. Oxford, New York, 2000

HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angew. Chemical International**. Ed., v.48, p. 4688-4716, 2009.

HIMEJIMA,M.; KUBO,I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil, **Journal of Agriculture Food Chemical** v.39,p. 418–421, 199.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE JUNIOR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**. v. 245, p. 245-249, 1990.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). *Câncer no Brasil: Incidência de câncer no Brasil (Estimativa 2014)*. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=1>. Acesso em: 24/03/2014.

ITOKAWA, H., TOTSUKA, N.; NAKAHARA, K.; MAEZURU, M.; TAKEYA, K.; KONDO, M.; INAMATSU, M.; MORITA, H.. A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from *Ginkgo biloba* L. **Chemistry Pharmacy Bulletin** 37, 1619–1621, 1989.

JOHNSON, F AND HUFF, J. Development of multi-organ rat for evaluating chemopreventive agents: efficacy of indole-3-canabinol- Certain health supplements may cause both carcinogenic and anticarcinogenic effects. **Carcinogenesis** vol.23 no.10 pp.1767–1768, 2002

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutatation Research**. v. 363, p. 89-96, 1996.

KELLOFF, G.J.; CROWELL, J.A.; STEELE, V.E.; LUBET, RA, BOONE CW, MALONE WA, HAW ET, LIEBERMAN LAWRENCE JA, KOPELOVICH L, ALI T, VINER JL, SIGMAN CC. Progress in cancer chemoprevention, **N. Y. Acad. Sci.** 1999; 889: 1-13.

KONG, Q. & LILLEHEI, K.O.. Antioxidant inibithors for cancer therapy. **Med. Hypotheses**, v. 51, p. 405-409, 1998.

KOZUBEK, A. & TYMAN, J. H. P. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. **J.Am. Chem. Soc.**,v. 99, p. 1-25, 1999.

KUBO, I.; KOMATZU, S.; OCHIM, M. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. 34: 970-973, 1986.

KUBO, I.; OCHIM, M.; VIEIRA, P.C.; KOMATSU, S. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. **Journal of Agriculture Food Chemistry** 41: 1012-1015, 1993.

KUBO, J.; LEE, J.R. AND KUBO, I. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew Apple. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. v.47, p.533-537, 1999.

KUBO, I.; NIHEI, K. AND TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Agriculture Food Chemistry**. v.51, p.7624-7628, 2003

KUBO, I.; MASUOKA,N.; HÁ, T.J. AND TSUJIMOTO, K. 2006. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**. 99:555-562, 2006.

KUBO, I.; NITODA, T.; TOCOLI FE, GREEN IR: Multifunctional cytotoxic agents from *Anacardium occidentale*. **Phytotherapy Research**. 25:38-45, 2011.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communications**, v. 2, p. 103-115,1995.

KISHI, M.; HORIGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. **Mutation Research...**, v. 278, p. 205-208, 1992.

KERR, J.R.F; WINTERFORD, C.M; HARMON, B.V. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013-2026, 1994.

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br Journal of Cancer** 26:18, 1972.

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

LORENZI, H. Árvores Brasileira: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum, 1992

MAXWELL, S.R.J.. Prospects for the use antioxidant therapies. *Drugs* , v. 49, p. 345-61,1995.

MILLER, E.C & MILLER, J.A. Mechanisms of chemical carcinogenesis. **Cancer**, 47: 1055-64, 1981.

MOTHÉ, C.G.; MILFONT JR, W.N. Aplicações do LCC (Líquido da Casca da Castanha de Caju). *Rev Quim Ind* 695: 15-19, 1994

MUROI, H.; NIHEI, K.; TSUJIMOTO, K. AND KUBO, I. Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.**Bioorg. Medicinal Chemistry**, V.12, p.583-587, 2004

MELBIUS, R.E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Rev. Immunology**. v. 5, p. 606-616, 2005.

MORRISON, S.J.; UCHIDA, N.; WEISMANN, I.L. The biology of hematopoietic stem cells. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 11, p. 35-71, 1995.

CARVALHO, A.L.N.; ANNONI, R.; SILVA, P.R.P.; BORELLI, P.; FOCK, R.A.; TREVISAN, M.T.S.; MAUAD, T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**.135:730-736,2011.

NAVARRO S.D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; PESARINI J.R.; GOMES, R.D.S.; KARAZIACK C.B.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; ROMÃO, W.; JUNIOR, W.L.; MAURO, M.O. AND OLIVEIRA, R.J.A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3Hisobenzofuran- 1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. **European Journal of Medicinal Chemistry** 75 (2014) 132e142

OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, A.F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.1225-1233, 2006.

OGA, Z. **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. Editora Atheneu, São Paulo, p.39-44, 2003.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, P. Factors influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. **Experience Cellular Research**.v. 198, p. 259-267, 1992.

OLIVEIRA, R.J.; SALLES, M.J.; DA SILVA KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO A.C.S.; FREIRIA, G.A.; MATIAZI H.J.; RIBEIRO L.R.; MANTOVANI, M.S. Effects of the polysaccharide  $\beta$ -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice, **Regul. Toxicology Pharmacology** 53 (2009) 164–173.

PITOT, H.C. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. **Jpn. Journal Research.**, v. 80, p. 599-607, 1989.

PARKE, D.V. Activation mechanisms to chemical toxicity. **Arch. Toxicol.**, 60: 5-15, 1987.

PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v.5, p. 2280-6, 1991.

PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v.72, p. 962-7, 1993

PETERMANN, A.; MIENE, C.; SCHULZ-RAFFELT, G.; PALIGE, K.; HÖLZER, J.; GLEI, M.; BÖHMER. F.D. GSTT2, a phase II gene induced by Apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage. **Molecular Nutrition Food Reseserach**, v. 53, p.1245-1253, 2009.

PIO CORRÊA, M. Dicionário de plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologi**. 5 ed, Rio de Janeiro: Lesevier, 2004

RIBAS, G.; FRENZILLI, G.; BARALE, R.; MARCOS, R. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell electrophoresis (SCGE) assay. **Mutatation Research**. v. 344, p. 41-54, 1995.

ROSS, G. M.; MCMILLAN, T. J.; WILCOS, P.; COLLINS, A. R. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications-Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research in 1994. **Mutatation Research**. v. 337, p. 57-60. 1995.

ROVOZZO, GC; BURKE, CN. A manual of basic virological techniques. New Jersey: Prentice Hall, p. 159, 1973.

RAFF, M.C. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**. v. 356, 397- 400, 1992.

SPORN, M.B. Approaches to prevention of the epithelial cancer during the pre-neoplastic period. **Cancer Research**. 1976;36:2699-702.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J.; EDS. Fundamentos de Genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

SIMIC, D.; VUKOVIC-GACIC, B.; KNECEVIC-VUKCEVIC, J. Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. **Mutation Research**. v.402,p.52-57, 1998.

SIES, H. Strategies of antioxidante defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, 215: 213-219, 1993.

SIES, H.. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**. v. 215, p. 213-219, 1999.

STORZ, G.; CHRISTMAN, M.F.; SIES, H.; AMES, B.N Spontaneous Mutagenesis and oxidative damage to DNA in Salmonella Typhimurium. **Proceedings of the National Academy of Science**. USA, v.84, p.8917-8921, 1987.

SMITH, M.A.; PERRY, G.; RICHEY, P.L.; SAYRE, L.M.; ANDERSON, V.E.; BEAL, M.F. Oxidative damage in Alzheimer's .**Nature**, v.382, p. 120-121.

SANTOS, H.S. & CRUZ, W.M.S.. The antioxidant vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. **Rev. Bras. Canc.**,v. 47, p. 303-308, 2001.

STASIUK, M. & KOZUBEK, A. Biological activity of phenolic lipids. **Cellular Molecular Life Scienc**. v. 67, p. 841-860, 2010.

SAVVA, D. The use of arbitrarily primed PCR (AP-PCR) fingerprinting to detect exposure to genotoxic chemicals. **Ecotoxicology**, v. 9, p. 341-353. 2000.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cellular Reserach**. v.175, 184-191, 1988.

SANDERSON, C.J. Interleukin-5, eosinophils, and diseases. **Blood**, v. 79, n. 2, p. 3101-3109, 1992.

SUZUKI, H.; KATAYAMA, N.; IKWTA, Y.; MUKAI, K.; FUJIEDA, A.; MITANI, H. Activities of granulocyte-macrophage colony – stimulating factor and interleukin-3 on monocytes. **Am. Journal of Hematological**, v. 75, p. 179-189, 2004.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The cometaAssay (Single-Cell Gel Test), a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: HENDERSON, D.

S. Methods in molecular biology: DNA repair protocols - Eukaryotic Systems. Totowa: **Humana Press**. 1999, p.203-211.

SHOBBA, S.V.; KRISHNASWAMY, P.R.; RAVINDRANATH, B. Phenolic lipid composition during development of cashew. **Phytochemistry**. 31: 2295-2297,1992.

TABATA, H.; KATSUBE, T.; TSUMA, T.; OHTA, Y.; IMAWAKA, N.; UTSUMI, T. Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus Japonicas*. **Foods Chemistry**, v.109,p.64-71, 2008.

TYMAN, J.H.P.; JOHNSON, R.A.; MUIR, M.; ROKHGAR, R. The extraction of natural cashew nut-shell liquid from the cashew nut (*Anacardium occidentale*). **J Am Oil Chem Society**. 66: 553-557, 1989.

TYMAN, J. H. P. In Synthetic and Natural Phenols, Elsevier, NY, 1996.

TEERASRIPREECHA, D.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; PUTHONG, S.; KIMURA, K.; OKUYAMA, M.; MORI, H.; KIMURA, A. AND CHANCHAO C. In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2012, 12:27.

TYCHOPOULOS,V.; TYMAN, J.H.P. Long chain phenols-the thermal and oxidative deterioration of phenolic lipids from the cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell. **Journal of Scienc Foods Agriculture**. 52: 71-83, 1990.

TICE, R. R. The single cell gel/ Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D. H. E.; VENITT, S. Environmental Mutagenesis. Oxford: **Bios Scientific Publishers**, 1995. p.315-339.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F.. The single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. **Mutation Research**. v. 35, p. 206-221, 2000.

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

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RODHES, C.S.J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and cellular Biochemistry**. v.266. p. 37-56, 2004.

VELDERS, G.A.; FIBBE, W.E. Involvement of proteases in cytokine-induced hematopoietic stem cell mobilization. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1044, p. 60-69, 2005.

WATERS, M.D.; BRADY, A.L.; STACK, H.F.; BROCKMAN, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds, **Mutation Reserach**. 238, 57-85, 1990.

WOLFF, S.P.; GARNER, A.; DEAN, R.T. Free radicals lipids and protein degradation. **Trends in Biochemical sciences**, v.11. p.27-31, 1986.

WÜNSCH FILHO, V.; ZAGO, M. A, Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphisms and environment. **Revista de Saúde Pública**, Brasil, 39:490-7, 2005.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a genotoxicidade, a mutagenicidade, o potencial imunomodulatório, quimiopreventivo e apoptótico do cardanol *in vivo*.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos genotóxicos do cardanol, por meio do ensaio do cometa;

Avaliar a mutagenicidade do cardanol, por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico.

Avaliar a atividade imunoestimulatória do cardanol, por meio dos ensaios de fagocitose esplênica e contagem diferencial de células do sangue;

Avaliar a atividade apoptótica do cardanol, por meio do ensaio de apoptose.

Avaliar os parâmetros biométricos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos com cardanol e ciclofosfamida, através dos pesos relativos dos órgãos e/ ou variação de peso.

Avaliar a genotoxicidade, a mutagenicidade, o potencial imunomodulatório, quimiopreventivo e apoptótico do cardanol de cadeia lateral saturada frente ao quimioterápico ciclofosfamida *in vivo*.

### 3. ARTIGO

**Cardanol: avaliação toxicogenética e seus efeitos antígenotóxico, antimutagênico e antiapoptótico quando associado à ciclofosfamida.**

Beatriz Usinos Catelan Schneider<sup>1,2</sup>, Alisson Meza<sup>3</sup>, Adilson Beatriz<sup>3,4</sup>, Pamela Castilho de Carvalho<sup>1,2</sup>, Mariana de Oliveira Mauro<sup>5</sup>, Caroline Bilhar Karaziack<sup>3</sup>, Andréa Luiza Cunha Laura<sup>4</sup>, Antônio Carlos Duenhas Monreal<sup>4</sup>, Denis Pires de Lima<sup>3</sup>, Rodrigo Juliano Oliveira<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil;

<sup>2</sup>Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica, Núcleo de Hospital, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil;

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil;

<sup>4</sup>Programa de Mestrado em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil;

<sup>5</sup>Programa de Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade – Rede Pró Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil;

## Resumo

Em função da provável atividade antioxidante do cardanol o mesmo possui indicativo para testes na área de genética toxicológica e carcinogênese. Por isso avaliou-se a genotoxicidade, a mutagenicidade, o potencial imunomodulatório, quimiopreventivo e apoptótico do cardanol de cadeia lateral saturada (2,5, 5 e 10mg/Kg), isolado e em associação com a ciclofosfamida (100mg/Kg), em camundongos Swiss. Os resultados indicaram que o cardanol é genotóxico e mutagênico para a menor e a maior doses testadas, respectivamente, e não estimula fagocitose esplênica e nem apoptose. Quando associado a ciclofosfamida apresenta atividade antígenotóxica, antimutagênica, sendo essa mais expressiva, e antiapoptótica. Destaca-se ainda que o cardanol associado e/ou isolado possui baixa atividade imunomodulatória. Assim, considera-se que o cardanol não deve ser usado em associação com o agente antitumoral ciclofosfamida e em especial como um coadjuvante quimioterápico. No entanto, pela sua baixa toxicidade, a relação risco/benefício, sugere o seu uso como quimiopreventivo o que demonstram potencial terapêutico.

Palavras-chave: lipídeo fenólico, quimioterapia, micronúcleo, ensaio do cometa, apoptose

## Abstract

According to the possible antioxidant activity of cardanol about same indication for testing in the field of genetic toxicology and carcinogenesis. Therefore we evaluated the genotoxicity, mutagenicity, the immunomodulatory potential chemopreventive and apoptotic saturated cardanol side chain (2.5, 5 and 10mg/kg), alone and in combination with cyclophosphamide (100mg/kg) in Swiss mice. The results indicated that the cardanol is genotoxic and mutagenic for the lowest and the highest doses tested respectively; and does not stimulate phagocytosis and splenic or apoptosis. However, when associated with cyclophosphamide has antigenotoxic activity, antimutagenic, this being more expressive, and antiapoptotic. Note also that the cardanol associated and / or has low immunomodulatory activity isolated . Thus, it is considered that the cardanol should not be used in association with chemotherapy cyclophosphamide and in particular as a chemotherapeutic adjuvant. However, its low toxicity, suggests its use as a chemopreventive , risk / benefit ratio, demonstrating the therapeutic potential.

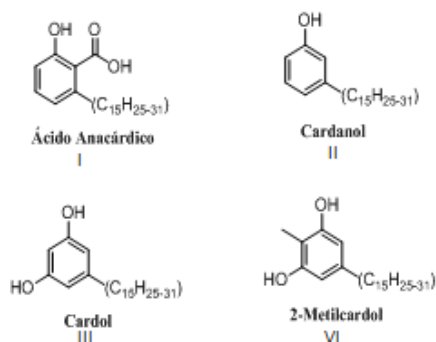
Palavras-chave em inglês: phenolic lipids, chemotherapy, micronucleus, comet assay, apoptosis.

## 1. Introdução

O câncer é uma doença crônico-degenerativa de alta prevalência global (FERREIRA; OLIVEIRA, 2006; FLORIANI; SCHARMM, 2006). É reconhecida como uma importante questão de saúde pública (INCA, 2014) e segundo a Organização Mundial de Saúde foi responsável pela morte de 8,2 milhões de indivíduos no ano de 2012. Essas mesmas instituições estimam que em 2030 cerca de 75 milhões pessoas terão câncer e 17 milhões de mortes ocorrerão por causa dessa doença no mundo (FERLEY, 2012; IARC, 2014 OMS, 2014).

Diante deste cenário, estudos que busquem compostos naturais com capacidade de proteger o DNA, bem como elucidem possíveis mecanismos quimiopreventivos ou quimioterápicos são cada vez mais necessários. A quimioprevenção, segundo SPORN (1976) é definida como o uso sistêmico de agentes químicos naturais ou sintéticos, para reverter ou suprimir a transformação de lesões pré-malignas em malignas. Dentre essas substâncias destacam-se aquelas com atividades antioxidantes (MIGUEL et al., 2010), antígenotóxicas (SKANDRANI et al., 2010), antimutagênicas (MALINI et al., 2010) e capazes de ativar vias de reparo de DNA (DUARTE et al., 2009).

Um forte candidato a apresentar essas atividades é o líquido das cascas da castanha de caju. Estudos demonstraram que os lipídeos fenólicos obtidos do líquido das cascas da castanha de caju (Figura 1) possuem atividade antibacteriana (BOUTTIER et al., 2002; KUBO; NIHEI AND TSIMOTO, 2003 e KUBO et al., 2006), antioxidante e antimutagênica (MELO CAVALCANTE et al, 2003; TREVISAN et al, 2006; RODRIGUES et al, 2006; DE LIMA et al, 2008). Dentre os lipídeos fenólicos, o cardanol foi selecionado para estudo, o qual é um lipídio com longa cadeia alifática ligada ao um anel fenólico (BRADY et al., 2000 e BAERSON et al., 2010; STASIUK; KOZUBEK, 2010). Para este composto já foram descritas as ações antibacteriana (BEGUM et al., 2002), larvicida ( LAMONACO et al., 2009) e antioxidante (TREVISAN et AL., 2006). Considerando estas promissoras atividades biológicas, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a genotoxicidade, a mutagenicidade, o potencial imunomodulatório, quimiopreventivo e apoptótico do cardanol de cadeia lateral saturada em camundongos *Swiss*.



**Figura 01.** Estrutura química dos lipídios fenólicos obtidos do LCC (Líquido das Cascas da Castanha de caju).

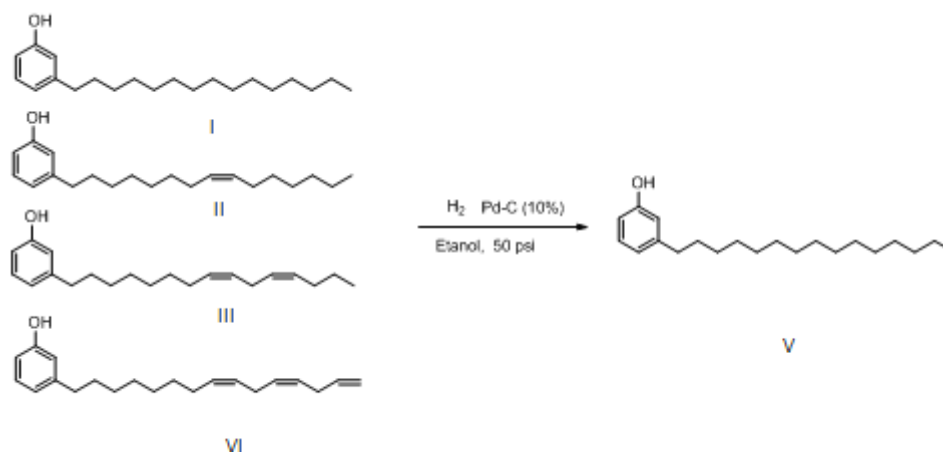
Estruturas que compõem o LCC estão indicadas por I, II, III e VI.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Obtenção do Cardanol

O cardanol foi obtido de acordo com a técnica descrita por SRINAVASA RAO et al. (2002) com modificações. Primeiramente, 5 g de do líquido das cascas da castanha de caju técnico (Cascaju Agroindustrial S/A; Lote 2001) foram solubilizadas em 30 mL de metanol e 20 mL de hidróxido de amônio. A solução foi misturada em agitador magnético por 10 minutos. O cardanol foi extraído com hexano (3 x 20 mL), e as fases hexânicas foram reunidas e neutralizadas com HCl 0,1M (2 x 20 mL), sendo o solvente a seguir evaporado. Procedeu-se uma cromatografia em camada delgada e as cromatofolhas, reveladas por ultravioleta, demonstram a presença de cardanóis e outros lipídios fenólicos. Para a separação de tais compostos, fez-se uma cromatografia líquida em coluna, sílica-gel tipo flash, sendo o eluente composto de 10/1 de hexano/acetato de etila (v/v). Obteve-se aproximadamente 1,3 g de cardanóis de cadeia insaturada deste processo. A mistura de cardanóis de cadeia insaturada foi submetida a uma hidrogenação catalítica em hidrogenador Parr3911EG® para a conversão dos compostos de cadeia insaturada em cardanol de cadeia saturada (Figura 2). Uma amostra de 1.8 g de cardanóis foi solubilizada em 50 mL de etanol, juntamente com 0,1 g de (Pd-C) Paládio em carvão ativo (10%). A solução foi hidrogenada em agitação por sete horas a pressão de 50 psi, sendo a seguir filtrada com celite. O produto foi previamente purificado por cromatografia líquida em coluna, com o mesmo eluente anteriormente empregado,

sendo o produto, 3-pentadecilfenol, recristalizado em etanol a 90%. O sólido cristalino branco (1.1 g) foi posteriormente analisado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ ), confirmando a pureza do composto (Figura 2).



**Figura 02.** Hidrogenação catalítica da mistura de cardanóis.

As estruturas I,II,III e IV : representação da mistura de cardanóis com cadeia lateral não saturada  
A estrutura V: representação do cardanol com cadeia lateral saturada, após hidrogenação catalítica

### 2.2 Delineamento experimental

O cardanol foi primeiramente diluído em *Tween* 80 (4%) (WENT, 1977) e posteriormente em etanol (1%). O composto foi administrado nas doses de 2,5; 5,0 e 10,0mg/kg p.c., i.p. A dose 2,5 mg/kg foi baseada em experimento realizado por Wu et al., 2011 na dose 2mg/kg, as maiores doses foram propostas por nosso grupo. Como controle positivo foi utilizado o agente quimioterápico ciclofosfamida (Fosfazeron®, laboratório Ítaca, REG. M.S. Número 1.26030056002-1; Batch 063020, Brasil) na dose de 100mg/kg de peso corpóreo (p.c.) administrado via intraperitoneal (i.p.) em dose única (Navarro et al., 2014).

Foram utilizados 40 camundongos da linhagem *Swiss (Mus musculus)*, machos e sexualmente maduros, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CCBS/UFMS). Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais (n = 5). Durante todo o experimento os camundongos foram mantidos em caixas de propileno recobertas por sepilho e alimentados com ração comercial (Nutival®) e água filtrada *ad libitum*. A luminosidade e temperatura foram controladas utilizando-se de fotoperíodo de doze horas (12 horas no escuro + 12 horas no claro), com

temperatura de  $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade de  $55\%\pm 10\%$ , em estante ventilada (ALESCO®). O experimento foi realizado segundo as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS (Protocolo Número 399/2011 e 523/2013).

Para fins comparativos, todos os tratamentos, que incluem o cardanol, foram realizados com o veículo Tween 4% e etanol 1%. Já aqueles que incluem a ciclofosfamida utilizou-se o veículo solução fisiológica 0,9%. Os grupos experimentais e a dosagem dos compostos são apresentados na tabela 1. As aplicações ocorreram simultaneamente. Após 24, 48 e 72h da administração do cardanol, foram coletadas amostras de  $20\mu\text{L}$  de sangue periférico para o ensaio do micronúcleo. Após 24h coletou-se  $20\mu\text{L}$  de sangue periférico, para realização do ensaio do cometa. Outra alíquota de  $20\mu\text{L}$  foi coletada em 72h para a contagem diferencial de células do sangue. Após 72h de experimentação os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de órgãos para os ensaios de fagocitose esplênica e de apoptose.

	<b>Cardanol</b>	<b>Ciclofosfamida</b>
C-	-	-
CP	-	100mg/kg
Car-2,5	2,5mg/kg	-
Car-5	5 $\mu\text{m}$ /kg	-
Car-10	10mg/kg	-
CP+Car-2,5	2,5mg/kg	100mg/kg
CP+Car-5	5mg/kg	100mg/kg
CP+Car-10	10mg/kg	100mg/kg

**Tabela 01.** Grupos experimentais e dosagem dos compostos

## 2.3 Ensaio Biológicos

### 2.3.1. Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado segundo as descrições de SINGH et al. O material foi analisado em microscópio de epifluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A) em aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm como descrito por KOBAYASHI et al, (1995). Foram analisadas visualmente 100 células por tratamento. O escore total foi calculado pela somatória dos valores resultantes da multiplicação do total de células com danos observadas em cada classe de lesão as quais pertenciam pelo valor da classe.



### 2.3.2 Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico

O ensaio do micronúcleo em sangue periférico foi realizado segundo HAYASHI et al. (1990) com modificações de OLIVEIRA et al. (2009). Uma alíquota de 20µL de sangue periférico foi colocada sobre uma lâmina previamente recoberta por 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0mg/mL). Em seguida depositou-se uma lamínula sobre o material biológico e a lâmina permaneceu em freezer (-20°C) por um período mínimo de sete dias. Analisou-se 1.000 células (reticulócitos) por animal em microscópio de epifluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A), na objetiva de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm.

### 2.3.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica

Um fragmento do baço, aproximadamente 1/3 do tamanho do órgão, foi macerado em solução fisiológica 0,9%. 100µL da suspensão celular foram colocadas em uma lâmina previamente corada com 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0mg/mL) e recoberta por uma lamínula. As lâminas foram estocadas em freezer até o momento da análise. A análise foi feita em microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A) em um aumento de 40x com filtro de 420-490nm e filtro de barreira de 520nm. Foram analisadas 200 células por animal. A ausência ou presença de fagocitose foi baseada na descrição de HAYASHI et al. (1990) e ISHII et al. (2011).

### 2.3.4 Ensaio de apoptose

100µL de uma solução de macerado de baço, fígado ou rim foram utilizados para confecção de um esfregaço. Após este procedimento, fixou-se a lâmina em Carnoy por 5 minutos e em seguida a mesma foi submetida a uma bateria de concentrações decrescentes de etanol (95%, 75%, 55% e 25%), seguida de lavagem com Tampão *Mcllvaine* por 5 minutos, coloração com alaranjado de acridina (0,01%, 5 minutos) e nova lavagem com o tampão. A identificação das células em apoptose (100 células/animal) se deu por meio da análise de padrões de fragmentação do DNA segundo ROVOZZO (1973) e NAVARRO et al. (2014). Os

procedimentos foram realizados em microscópio de epifluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A) em aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm.

### 2.3.5 Contagem Diferencial de Células do Sangue

20µL de sangue periférico foram utilizados para fazer um esfregaço em lâmina histológica. Essas foram secas ao ar livre e coradas com Giemsa (10%) por 10 minutos. A leitura das lâminas foi feita por microscopia de campo claro (Motic®, modelo BA 310) em aumento de 1.000x. Foram analisadas um total de 100 células/animal e diferenciadas em linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

### 2.3.6 Cálculo da porcentagem de redução de danos (RD%) e análise estatística

A porcentagem de redução de danos foi calculada de acordo com a fórmula proposta por MANOHARAN & BENERIEE (1985) e WATERS et al. (1990). Esse resultado permite inferir a capacidade quimiopreventiva de uma substância quando essa é associada a uma substância sabidamente mutagênica. Os valores foram expressos em média ± SEM e os dados foram analisados por ANOVA/Tukey pelo software *GraphPad Prism* (version 3.02; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) . O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

$$RD\% = \left[ \frac{\text{Média do controle positivo} - \text{Média do grupo associado}}{\text{Média do controle positivo} - \text{Média do controle negativo}} \right] \times 100$$

## 3. Resultados

### 3.1 Obtenção do cardanol

A extração do cardanol de cadeia saturada do líquido das cascas da castanha de caju seguiu o protocolo descrito anteriormente, descrito por SRINAVASA et al. (2002). No entanto, o grau de pureza necessário não foi alcançado. Esse fato determinou a realização de uma cromatografia líquida em coluna para a obtenção da pureza da mistura de cardanóis, o que culminou num rendimento de 26% em massa. Finalmente, por hidrogenação catalítica dos cardanóis pode obter o rendimento de 61% em massa. O cardanol, 3-pentadecilfenol, foi então purificado por cromatografia líquida em coluna, tendo a pureza do composto para os ensaios de atividade biológica reforçada por um processo extra de recristalização em etanol a 90%. A pureza foi confirmada por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  a frequência de 300 MHz em  $\text{CDCl}_3$ . Os dados espectroscópicos foram comparados com os mesmos já descritos na literatura confirmando a pureza do produto.

### 3.2 Ensaio Biológicos

#### 3.2.1. Parâmetros Biométricos dos animais:

Os pesos inicial e final e o ganho/redução de peso dos animais durante o período experimental não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 2). O peso relativo dos rins e coração coletados dos animais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. O peso relativo do fígado apresentou redução ( $p < 0,05$ ) no grupo tratado com ciclofosfamida e cardanol na menor dose e uma tendência à redução nas duas outras associações, o mesmo aconteceu com o peso do baço. O peso relativo do pulmão apresentou redução ( $p < 0,05$ ) somente no grupo tratado com ciclofosfamida associada ao cardanol na menor dose (Tabela 3).

#### 3.2.2. Ensaio do cometa e micronúcleo:

Os resultados observados para o ensaio do cometa mostram que a menor dose do cardanol testada demonstrou atividade genotóxica ( $p < 0,05$ ) e as outras duas doses testadas apresentaram uma tendência ao aumento de danos genômicos. A

administração do cardanol determinou aumento de 2,03, 1,74 e 1,67x se comparado à ocorrência de danos no grupo controle. A avaliação da antigenotoxicidade demonstrou-se significativa para a maior dose de cardanol e uma tendência para as outras doses testadas. As %RD foram de 31,76; 18,90 e 18,90% para as doses de 2,5; 5,0 e 10µg/kg, respectivamente (Tabela 4).

Já para o ensaio do micronúcleo, a avaliação após 24h de tratamento demonstrou que a menor dose do cardanol não foi mutagênica. No entanto, a maior dose apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) da ordem de 1,63x. Os resultados demonstraram relação dose-resposta. Após 48h, a mutagenicidade da maior dose não se manteve, porém foi observada uma tendência de aumento dose dependente. Já na avaliação após 72h, a mutagenicidade voltou a ser observada para a maior dose e para as outras duas observou-se somente uma tendência ao aumento de danos no DNA (Tabela 4).

Em relação à avaliação da antimutagenicidade observou que há uma relação inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a dose de cardanol menor a atividade quimiopreventiva para todos os momentos avaliados. A redução de danos no DNA foi significativa para todas as doses testadas e em todos os momentos, e as %RD foram de 65, 57 e 45% após 24h, 88, 86 e 63% após 48h e 97, 92 e 77% após 72h de tratamento para as doses de 2,5, 5 e 10µg/kg, respectivamente (Tabela 5).

### 3.2.3. *Ensaio de Fagocitose Esplênica:*

Observa-se no ensaio de fagocitose esplênica que a administração do cardanol isoladamente não altera os índices de fagocitose esplênica. A ciclofosfamida, por sua vez, aumenta ( $p < 0,05$ ) a frequência de fagocitose e quando associada ao cardanol, este não determina alterações nos índices de atividade do baço, quando comparado ao quimioterápico (Tabela 6).

### 3.2.4. *O Ensaio de Apoptose:*

Ao analisar a apoptose, nota-se que a ciclofosfamida administrada aumenta ( $p < 0,05$ ) a frequência de apoptose em células hepáticas, renais e esplênicas na

ordem de 10, 12,9 e 7,4x, respectivamente. A administração do cardanol isoladamente não causa aumento dos índices de apoptose e quando associado à ciclofosfamida reduz ( $p < 0,05$ ) os efeitos apoptóticos causados por esse quimioterápico (Tabela 7). Observa-se também que a redução dos efeitos apoptóticos da ciclofosfamida é da ordem de 6, 5,6 e 6,4x para o fígado; 5,6, 4,3 e 2,3x para os rins e 6,8, 5,3e2,8x para o baço para as doses de 2,5, 5,0 e 10,0mg/kg, respectivamente.

### 3.2.5. Contagem Diferencial de Células do Sangue:

A análise estatística da contagem diferencial de células sanguíneas dos animais demonstrou que não há diferenças significativas para a frequência de monócitos, eosinófilos e basófilos entre os diferentes grupos experimentais. No entanto, todos os grupos apresentam uma discreta basofilia e os grupos tratados com as duas menores doses de cardanol e a maior dose associada à ciclofosfamida uma discreta eosinofilia. Somente o grupo tratado com a maior dose de cardanol apresentou monocitose (Tabela 8).

Em relação aos linfócitos e neutrófilos pode-se perceber uma redução e um aumento ( $p < 0,05$ ), respectivamente para o grupo tratado com a ciclofosfamida associada à menor dose do cardanol. Esse mesmo grupo foi o único que apresentou valores fora dos padrões de referência.

## 4. Discussão

Dentre os diferentes compostos com possível atividade antioxidante, optou-se pela avaliação do cardanol que se mostrou capaz tanto de causar quanto prevenir danos genotóxicos. Quando administrado isoladamente observou-se correlação inversamente proporcional quando avaliada a dose e a frequência de lesões no DNA, ou seja, quanto menor a dose maior a quantidade de células com danos no DNA. No entanto, as diferenças entre as doses não são significativas ( $p > 0,05$ ). Fato ainda a ser considerado é que a dose mais genotóxica (menor dose) também se mostrou a mais antigenotóxica e a porcentagem de redução de danos foi 1,68x maior que as outras duas doses testadas. Esse fato também foi observado por OLIVEIRA et al. (2013) que avaliou a  $\beta$ -glucana e observou que o mesmo composto

pode se comportar hora como genotóxico e hora como antígenotóxico. O mesmo foi observado por MIYAJIET et al (2004) em ensaio realizado com *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler e por OLIVEIRA et al (2009) em extratos de *Caesaria sylvestris*.

Quando avaliado o ensaio do micronúcleo, a dose hora genotóxica, e também com o melhor efeito antígenotóxico, não apresentou atividade mutagênica. Manteve-se ainda como aquela capaz de melhor proteger o DNA de mutações o que foi traduzido pelas maiores porcentagens de redução de danos nos três tempos de análise. Esses resultados permitem inferir que as lesões genotóxicas não foram fixadas no DNA na forma de mutações. Isto ocorre, pois as lesões detectadas pela versão alcalina do cometa pH>13, tais como danos diretos do tipo quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, crosslinks e sítios de reparo por excisão, e danos indiretos como lesões por metilação e adutos, que sendo álcali-lábeis, se expressam como quebras de fita simples frente ao tratamento alcalino (SINGH et al., 2000; TICE et al., 2000; HERMETO et al., 2014), podem ser reparadas e não se tornar mutações (OLIVEIRA et al., 2007). A antimutagênese pode ser mediada por dois mecanismos: a bioantimutagênese e a desmutagênese. Na bioantimutagênese, o antioxidante modularia o reparo e a replicação do DNA por meio de enzimas. No entanto, como o tratamento foi administrado de forma simultânea, ou seja, o agente quimioterápico e o agente antioxidante foram aplicados em seqüência, pode também ter ocorrido a ação desmutagênica. O modo de ação desmutagênico baseia-se principalmente na capacidade de um composto adsorver outro impedindo assim a sua ação (KADA et al., 1982; KADA AND SHIMOI, 1987; DE FLORA, 1998; DUARTE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2006, 2007, 2009, 2013, 2014).

Quando relacionada a frequência de micronúcleo após 72h de tratamento e a porcentagem de fagocitose esplênica pode-se observar que as menores frequências de micronúcleo estão relacionadas às maiores frequências de fagocitose esplênica. Este fato sugere que esteja ocorrendo a imunoestimulação causada pela ciclofosfamida, visto que o baço é responsável pela retirada de células micronucleadas da circulação sistêmica (ZU-WEI et al., 1992; BAZO et al., 2002) e esse quimioterápico, quando administrado isoladamente ou em associação com o cardanol, seria uma fonte de danos genéticos o que induziria o aumento da atividade fagocítica. No entanto, o cardanol neste contexto demonstrou que essa imunoestimulação não foi um mecanismo que favoreceu a ação antimutagênica, já

que mesmo em alta porcentagem de redução de danos mutagênicos, de até 97%, a frequência de fagocitose não aumentou em relação ao grupo ciclofosfamida.

Apesar dos indícios de imunomodulação inferidos pelo aumento da atividade fagocítica do baço a análise da contagem diferencial de células do sangue não demonstrou variações com relevâncias biológicas, sendo, portanto, contrários ao que foi descrito por Abbas e Lichtman (2005); Lorenzi (2006) e SNUSTAD ;SIMMONS (2008) , os quais referem presença de leucócitos como elementos efetores da resposta imune humoral e celular, no processo fagocitário, através do reconhecimento e morte de células infectadas, anormais e tumorais.

O ensaio de apoptose corrobora os dados do micronúcleo, ou seja, quanto maior a dose de cardanol associado à ciclofosfamida, menor a porcentagem de redução de danos e à medida que a porcentagem de redução de danos diminui há o aumento dos níveis de apoptose induzidos pelos danos mutagênicos causados pelo quimioterápico. Essa interpretação é válida para fígado, rins e baço. Destaca-se ainda que o cardanol é capaz de reduzir os níveis de apoptose causados pelo antineoplásico ciclofosfamida. O efeito antineoplásico desse fármaco é devido à sua capacidade de causar alterações genéticas que levam as células tumorais à morte celular por apoptose.

O mais comum é que a apoptose atue na eliminação de células micronucleadas, ou seja, com danos clastogênicos (FENECH et al., 1999). Porém, VUKICEVIC et al. (2004) considera que uma alta frequência de apoptose pode correlacionar-se a danos genéticos que não resultariam no aumento visível de micronúcleos e que também é possível que o aumento de micronúcleos mesmo quando os índices de apoptose apresentam-se normais. A provável explicação para tal fato seria uma possível supressão apoptótica nas células micronucleadas, tornando-se estas necróticas antes mesmo de passarem pela mitose.

Diante do exposto, os resultados indicam que o cardanol é um lipídeo fenólico que não deve ser usado em associação com o quimioterápico ciclofosfamida e em especial como um coadjuvante quimioterápico devido à sua atividade antigenotóxica, antimutagênica e antiapoptótica. No entanto, pela sua baixa toxicidade observada, a relação risco/benefício, sugere novos estudos que possam melhor avaliar e indicar esse composto como quimiopreventivo para lesões no DNA induzida por agentes alquilantes e/ou geradores de radicais livres. Esses fatos demonstram potencial terapêutico.

## 5. Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 6. Referências

FERREIRA.; OLIVEIRA, C. Conhecimento e significado para funcionárias de indústrias têxteis sobre prevenção do câncer do colo-uterino e detecção precoce do câncer da mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*. São Paulo, 2006. p.11

FLORIANI, C. A.; SCHRAMM, F.R. Cuidador do idoso com câncer avançado: um ator vulnerado. *Caderno de Saúde Pública*, v 22. p.527-534, 2006.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Câncer no Brasil: Incidência de câncer no Brasil (Estimativa 2014). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=1>. Acesso em: 24/03/2014.

FERLAY, J.; et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC CancerBase, 11). Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 23 de março de 2014.

PERERA, F.P. Environment and cancer: Who are susceptible? *Science*, 278:108-1073, 1997

SPORN, M.B. Approaches to prevention of the epithelial cancer during the pre-neoplastic period. *Cancer Research*. 1976;36:2699-702.

MIGUEL, M.B.; NUNES., S.; DANDLEN, A.; CAVACO, A.M.; ANTUNES,M.D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food Chem. Toxicology*. p. 439-445, 2010.

SKANDRANI, I.; BOUBAKER, J.; BOUHLEL, I.; LIMEM, I.; GHEDIRA, K.; CHEKIRGHEDIRA, K. Leaf and root extracts of *Moricandia arvensis* protect against DNA damage in human lymphoblast cell K562 and enhance antioxidant activity. *Environ. Tox. Pharmacology*, v.30(1), p 61-67, 2010.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M.A.; MANTOVANI, M.S.; JAMAL, C.M.; NATI, N.; PASSOS, T.D.; MATSUMOTO, S.T. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. *Genetics Mol. Biol.*, v. 33 (1), p. 176-181, 2010.



DUARTE, T.I.; COOKE, M.S.; JONES, G.D.D. Gene expression profiling reveals new protective roles of vitamin c in human skin cells. *Free Rad. Biol. Med.*, v.46.2009.

AGOSTINI, T.S., JALES, K.A., OLIVEIRA, M.E.B., GARRUTI, D.S. Determinação espectrofotométrica do ácido anacárdico em amêndoas de castanhas de caju. Comunicado Técnico 122, EMBRAPA, Brasília, 2005.

MUROI H.; KUBO, I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Appl. Bacteriol.* (1996), 80: 387–395.

BOUETIER, S.; FOURNIAT, J.; GAROFALO, C.; GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. b-Lactamase Inhibitors from *Anacardium occidentale*. *Pharm Biol.* (2002), 40:231–234

KUBO, I.; NIHEI K.; TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Agric Food Chem.* (2003), 51:7624–7628

KUBO, I.; MASUOKA, N.; HA, T.J.; TSUJIMOTO, K. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chem.* 99: 555-562, 2006.

MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; RUBENSAM, G.; PICADA, J.N.; SILVA, E.G.; MOREIRA, J.C.F.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic evaluation, antioxidant potential and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice lowers mutagenicity of aflatoxin B1 in *S. typhimurium* TA102, *Genet. Mol. Biol.* (2003), 28: 328–333.

TREVISAN, M.T.S.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R.W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food Chem Toxicol.* (2006), 44:188-197.

RODRIGUES, F.H.A.; FEITOSA, J.P.A.; RICARDO, N.M.P.S.; DE FRANCA, F.C.F.; CARIOCA, J.O.B. Antioxidant activity of cashew shell nut liquid (CNSL) derivatives on the thermal oxidation of synthetic cis-1,4-polyisoprene. *J.Braz.Chem.Soc.* (2006), 17:265-271.

DE LIMA, S.G.; FEITOSA, C.M.; CITO, A.; MOITA NETO, J.M.; LOPES, J.A.D., LEITE, A.S.; BRITO, M.C.; DANTAS, S.M.M.; CAVALCANTE, A. Effects of immature cashew nut-shell liquid (*Anacardium occidentale*) against oxidative damage in *Sacharomyces cerevisiae* and inhibition of acetylcholinesterase activity. *Genet. Mol. Res.* (2008), 7: 806-818.

BRADY, S.F.; WAGENAAR, M.M.; SINGH, M.P.; JANSO, J.E.; CLARDY, J. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. *Org. Lett.* (2000), 2: 4043-4046.

BAERSON, S. R.; SCHRÖDER, J.; COOK, D.; RIMANDO, A. M.; PAN, Z.; DAYAN, F. E.; NOONAN, B. P.; DUKE, S. O. "Alkyresorcinol biosynthesis in plants: New

insights from an ancient enzyme family?" *Plant Signaling & Behavior* (2010), 5(10): 1286.

STASIUK, M.; KOZUBEK, A. Biological activity of phenolic lipids. *Cell Mol Life Sci.* (2010), 67:841-860.

BEGUM, P.; HASHIMOTO, Y.; ISLAM, M.T.; OGAWA Y AND TAHARA, S. Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*. *Z Naturforsch C.* (2002), 57:874-882.

LOMONACO, D.; SANTIAGO, G.M.P.; FERREIRA, Y.S.; ARRIAGA, A.M.C.; MAZZETTO, S.E.; MELE, G.; VASAPOLLO, G. Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. *Green Chem.* (2009), 11:31–33.

SRINIVASA RAO, A.; PHANI KUMAR, P.; PARAMASHIVAPPA, R.; VITHAYATHIL, J.P.; SUBBA RAO, P.V. Process for Isolation of Cardanol from Technical Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. Vittal Mallya Scientific Research Foundation, P.O. Box 406, K. R. Road, Bangalore 560 004, India  
*J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4705–4708

NAVARRO S.D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; PESARINI J.R.; GOMES, R.D.S.; KARAZIACK C.B.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; ROMÃO, W.; JUNIOR, W.L.; MAURO, M.O. AND OLIVEIRA, R.J.A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3Hisobenzofuran- 1-one: Evaluation of toxicology and ability topotentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *European Journal of Medicinal Chemistry* 75 (2014) 132e142

WENT VAN, G.F. Mutagenicity testing of 3 hallucinogens:LSD, psilocybin and  $\Delta^9$ -THC, using the micronucleus test. National Institute of Public Health, Laboratory of Pharmacology, P.O, Box 1, Bilthoven. (1977), p.324-325.

CHEN, H.Z.; LIU, Q.F.; LI, L.; WANG, W.J.; YAO, L.M.; YANG, M.; LIU, B., CHENS, W.; ZHAN, Y.Y.; ZHANG, M.Q.; CAI, J.C., ZHENG, Z.; LIN, S.C.; LI, B.A.; Wu, Q. The orphan receptor TR3 suppresses intestinal tumorigenesis in mice by downregulating Wnt signaling, *Gut* 61 (2012) 714–724.

SINGH, N.P.; MACCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantities of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* (1988), 175: 184–191.

OLIVEIRA, R.J.; SALLES, M.J.; DA SILVA KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO A.C.S.; FREIRIA, G.A.; MATIAZI H.J.; RIBEIRO L.R.; MANTOVANI, M.S. Effects of the polysaccharide  $\beta$ -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 53 (2009) 164–173.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay, *MMS Commun* 2 (1995) 103–115.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, J.R.M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutat. Res.* 245 (1990) 245–255.

ISHII, P.L.; PRADO, C.K.; MAURO, M.O.; CARREIRA, C.M.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R.; DICHI, J.B.; OLIVEIRA, R.J. Evaluation of *Agaricus blazei* *in vivo* for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 59 (2011) 412–422.

ROVOZZO, G.C.; BURKE, C.N. A manual of basic virological techniques, Prentice Hall, New Jersey, 1973.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M.R. Beta-carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture, *Cell Biol. Int. Rep.* 9 (1985) 783–789.

WATERS, M.D.; BRADY, A.L.; STACK, H.F.; BROCKMAN, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds, *Mutat. Res.* 238, 57–85, 1990.

AJITH, T. A.; SOJA, M. A comparative study on the antimutagenicity of atorvastatin and lovastatin against directly acting mutagens. *Cell Biol Toxicol*, v. 22, n. 4, p. 269 - 274, 2006.

HOEIJMAKERS, J.H.J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, v.411, p.366-374, 2001.

WEIJL, N.I.; HOPMAN, G.D.; WIPKINK-BAKKERA; LENTJES, E.G.W.M.; BERGER, H.M.; CLENTON, F.J AND OSANTO S. A.Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Ann Oncol.* 1998;9 (12):1331-7.

LAMSONL, D.W.; BRIGNALL. M.S. Antioxidants in cancer therapy their actions and interactions with oncologic therapies. *Alternative Med Rev* 1999; 4: 304-29.

OLIVEIRA R.J.; SALLES M.J.S.; DA SILVA, A.F.; KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.D.S.; LEITE, V.D.S.; MATIAZI H.J.; PESARINI J.R.; RIBEIRO, L.R. AND MANTOVANI, M.S. *In vitro* evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. *Genetics and Molecular Biology* 36,3 (2013) 413-424.

MIYAJI, C.K.; JORDAO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; COLUS, I.M.S. Genotoxicity and anti- genotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. *Genet. Mol. Biol.*, v. 27, p. 108–114, 2004.

OLIVEIRA, A.M.; SANTOS, A.G.; SANTOS, R.A.; SANTOS, A.G.; CSIPAK, A.R.; OLIVATO, C.; FREITAS, M.B.; BASSI, C.L.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; TAKAHASHI, C.S; SOARES, C.P. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F)

protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. *Mutagenesis*, v. 24 (6), p. 501-506, 2009.

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

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

HERMETO, L.C.; OLIVEIRA, R.J.; MATUO, R.; JARDIM, P.H.F.; Rafael De ROSSI, R.; SILVA, A.C.M.B.A.; DEFFUNE, E.; EVARISTO, T C.; SANTANA, A.R. Ensaio cometa em células tronco mesenquimais do tecido adiposo: efeitos do pH sobre a avaliação da integridade genômica. *Genet. Mol. Res.* Im press 2014.

OLIVEIRA R.J.; MATUO, R.; DA SILVA, F.; MATIAZI H.J.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO L.R. Protective effect of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicology in vitro* 21(2007) 41-52.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. Environmental desmutagens and antimutagens. In: E. J.KLEKOWSKI (Ed.). *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York, 1982, p. 137- 151.

KADA, T.; SHIMOI, K.. Desmutagens and bio-antimutagens: Their modes of action. *Bio Essays*, v. 7, p. 113-115, 1987.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, v.402, p. 151-8, 1998.

OLIVEIRA R.J.; RIBEIRO, L.R.; DA SILVA, A.F.; MATUO, R.; MANTOVANI M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanism of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleous test. *Toxicology in vitro* 20 (2006) 1225-1233.

OLIVEIRA R.J.; SALLES M.J.S.; SILVA A.F.; KANNO T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.D.S.; FREIRIA G.A.; MATIAZI H.J.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI M.S. Effects of the polysaccharide  $\beta$ -glucan on clstogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 53 (2009) 164-173.

OLIVEIRA R.J.; SALLES M.J.S.; .; SILVA A.F.; KANNO T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.D.S.; LEITE V.S.; MATIAZI H.J.; PESARINI J.R.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI M.S. *In vivo* evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. *Genetics and Molecular Biology* 36,3 (2013) 413-424.

OLIVEIRA R.J.; PESARINI J.R.; SALLES M.J.S.; KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.D.S.; LEITE, V.D.S.; DA SILVA, A.F.; MATIAZI H.J.; RIBEIRO, L.R. AND

MANTOVANI, M.S. Effect of  $\beta$ -glucan polysaccharide revealed lethal assay and micronucleous assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclofosfamide. *Genetics and Molecular Biology* 37,1 (2014) 111-119

ZU-WEI, G.; BAO-ZHEN, Z.; NATH, B.; WEN-ZONG, W.; WALLACE, W.E.; TONG-MAN, O. Micronucleus induction and phagocytosis in mammalian cells treated with diesel emission particles. *Mut. Res.* v.279, n. 1, p.55–60, 1992

BAZO, A.P.; RODRIGUES, M.A.M.; SFORCIN, J.M.; RIBEIRO, L.R.; CAMARGO, J.L.V.; SALVADORI, D.M.F. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, Londres, v. 22, n.3, p. 183-194, 2002

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. Elsevier, Philadelphia, PA, 2005.

LORENZI, T.F. *Manual de Hematologia. Propedêutica e Clínica*. 4<sup>th</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J..*Fundamentos de Genética*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 756p. 2001.

FENECH, M.; CROTT, J.; TUNER, J.; BROWN, S.. Necrosis, apoptosis, cytoxicity and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of method and results for hydrogen peroxide, *Mutagenesis*, v. 14, p. 605-612, 1999.

VUKICEVIC, V.; KAMPFINGER, K.; STOPPER, H.. Influence of altered apoptosis in human lymphoblastoid cell lines on micronucleus frequency, *Toxicology Letters*. v. 147, p. 187-95, 2004.

#### 4. ANEXOS

**Tabela 02** - Dados biométricos dos grupos experimentais expostos ao cardanol:

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Ganho de peso (g)</b>
C-	36,4±1,16 <sup>a</sup>	36,2±0,80 <sup>a</sup>	-0,2±0,38 <sup>a</sup>
CP	34,4±1,03 <sup>a</sup>	34,0±0,90 <sup>a</sup>	-0,4±0,51 <sup>a</sup>
Car-2,5	35,6±1,96 <sup>a</sup>	36,0±2,07 <sup>a</sup>	0,4±0,40 <sup>a</sup>
Car-5	34,4±0,24 <sup>a</sup>	34,8±0,20 <sup>a</sup>	0,4±0,24 <sup>a</sup>
Car-10	36,8±0,49 <sup>a</sup>	37,4±0,68 <sup>a</sup>	0,6±0,51 <sup>a</sup>
CP+Car-2,5	33,4±1,03 <sup>a</sup>	33,4±1,43 <sup>a</sup>	0,0±0,45 <sup>a</sup>
CP+Car-5	34,6±1,03 <sup>a</sup>	34,0±1,37 <sup>a</sup>	-0,6±0,51 <sup>a</sup>
CP+Car-10	33,8±0,86 <sup>a</sup>	34,2±1,11 <sup>a</sup>	0,4±0,51 <sup>a</sup>

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey).

**Tabela 03** - Peso relativo dos órgãos após período de experimentação:

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Fígado</b>	<b>Rins</b>	<b>Baço</b>	<b>Pulmão</b>	<b>Coração</b>
<b>Peso Relativo (g)</b>					
C-	0,0574±0,0046 <sup>b</sup>	0,0138±0,0008 <sup>a</sup>	0,0046±0,0005 <sup>a,b</sup>	0,0069±0,0002 <sup>b,c</sup>	0,0054±0,0005 <sup>a</sup>
CP	0,0553±0,0020 <sup>b</sup>	0,0144±0,0009 <sup>a</sup>	0,0072±0,0021 <sup>b</sup>	0,0078±0,0003 <sup>b,c</sup>	0,0050±0,0003 <sup>a</sup>
Car-2,5	0,0562±0,0029 <sup>b</sup>	0,0135±0,0009 <sup>a</sup>	0,0041±0,0002 <sup>a,b</sup>	0,0088±0,0002 <sup>c</sup>	0,0060±0,0003 <sup>a</sup>
Car-5	0,0518±0,0011 <sup>b</sup>	0,0125±0,0002 <sup>a</sup>	0,0042±0,0001 <sup>a,b</sup>	0,0080±0,0003 <sup>b,c</sup>	0,0047±0,0002 <sup>a</sup>
Car-10	0,0506±0,0000 <sup>a,b</sup>	0,0134±0,0006 <sup>a</sup>	0,0040±0,0004 <sup>a,b</sup>	0,0075±0,0005 <sup>b,c</sup>	0,0049±0,0003 <sup>a</sup>
CP+Car-2,5	0,0428±0,0014 <sup>a</sup>	0,0121±0,0007 <sup>a</sup>	0,0026±0,0001 <sup>a</sup>	0,0060±0,0006 <sup>a</sup>	0,0049±0,0003 <sup>a</sup>
CP+Car-5	0,0524±0,0026 <sup>a,b</sup>	0,0121±0,0007 <sup>a</sup>	0,0032±0,0002 <sup>a</sup>	0,0078±0,0005 <sup>b,c</sup>	0,0045±0,0003 <sup>a</sup>
CP+Car-10	0,0509±0,0003 <sup>a,b</sup>	0,0133±0,0003 <sup>a</sup>	0,0033±0,0004 <sup>a</sup>	0,0073±0,0003 <sup>a,b,c</sup>	0,0153±0,0106 <sup>a</sup>

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey).

**Tabela 04-** Frequência de células com danos no DNA, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de (anti) genotoxicidade do Cardanol no ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos:

Grupos Experimentais	Células com danos no DNA	Classes de danos				Escore	Porcentagem de redução de danos (%)
		0	1	2	3		
C-	15,2±2,26 <sup>a</sup>	84,8±2,26	9,8±2,15	3,8±0,66	1,6±0,81	22,2±3,2 <sup>a</sup>	-
CP	91,4±1,86 <sup>d</sup>	8,6±1,86	26,4±1,28	39,6±3,66	25,4±2,67	181,2±4,7 <sup>d</sup>	-
Car-2,5	30,8±1,43 <sup>b</sup>	69,2±1,43	23,8±1,11	5,2±0,58	1,8±0,37	39,6±2,6 <sup>a</sup>	-
Car-5	26,4±2,04 <sup>a,b</sup>	73,6±2,04	17,4±1,21	6,8±2,71	2,2±0,73	37,6±5,7 <sup>a</sup>	-
Car-10	25,4±1,72 <sup>a,b</sup>	74,6±1,72	20,6±2,54	3,0±0,83	1,8±0,73	32,0±1,4 <sup>a</sup>	-
CP+Car-2,5	67,2±6,91 <sup>c,d</sup>	32,8±6,91	63,4±7,06	1,4±0,51	2,4±0,40	73,4±7,0 <sup>b</sup>	31,76%
CP+Car-5	77,0±3,62 <sup>c,d</sup>	23,0±3,62	66,0±3,70	3,6±1,03	7,4±1,03	95,4±4,0 <sup>b</sup>	18,90%
CP+Car-10	77,0±2,77 <sup>c</sup>	23,0±2,77	57,4±2,65	7,8±1,06	11,8±1,59	108,4±5,7 <sup>c</sup>	18,90%

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey).



**Tabela 05** - Freqüência de micronúcleo em sangue periférico de camundongos:

Grupos Experimentais	Média ± EPM			Porcentagem de redução de danos %		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
	<b>Controles</b>					
C-	15,0±0,94 <sup>a</sup>	12,4±0,92 <sup>a</sup>	12,4±0,92 <sup>a</sup>	-	-	-
CP	66,2±2,90 <sup>e</sup>	40,8 ±3,52 <sup>e</sup>	40,8 ±3,52 <sup>e</sup>	-	-	-
Car-2,5	15,0±0,77 <sup>a</sup>	13,2±0,80 <sup>a,b</sup>	13,2±0,80 <sup>a,b</sup>	-	-	-
Car-5	17,8±1,39 <sup>a,b</sup>	14,0±0,90 <sup>a,b,c</sup>	14,0±0,90 <sup>a,b,c</sup>	-	-	-
Car-10	24,4±1,63 <sup>b</sup>	16,8±1,70 <sup>a,b,c</sup>	16,8±1,70 <sup>a,b,c</sup>	-	-	-
CP+Car-2,5	32,8±0,86 <sup>c</sup>	20,8±1,93 <sup>b,c</sup>	20,8±1,93 <sup>b,c</sup>	65%	88%	97%
CP+Car-5	37,0±2,55 <sup>c,d</sup>	22,0±1,26 <sup>c</sup>	22,0±1,26 <sup>c</sup>	57%	86%	92%
CP+Car-10	42,4±0,97 <sup>d</sup>	33,8±1,80 <sup>d,e</sup>	33,8±1,80 <sup>d,e</sup>	45%	63%	77%

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05; ANOVA/Tukey).

**Tabela 06-** Número total, frequência média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e porcentagem de células com ou sem evidência de fagocitose esplênica em camundongos:

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Células com evidência de fagocitose</b>	
	<b>Média<math>\pm</math>EPM</b>	<b>Porcentagem(%)</b>
C-	83,0 $\pm$ 2,84 <sup>a</sup>	41,5%
CP	154,8 $\pm$ 2,67 <sup>b</sup>	77,4%
Car-2,5	88,8 $\pm$ 2,88 <sup>a</sup>	44,4%
Car-5	92,2 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>	46,1%
Car-10	104,8 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>	52,4%
CP+Car-2,5	131,6 $\pm$ 3,20 <sup>b</sup>	75,8%
CP+Car-5	149,4 $\pm$ 11,15 <sup>b</sup>	74,7%
CP+Car-10	159,4 $\pm$ 5,45 <sup>b</sup>	79,7%

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey).

**Tabela 07-** Avaliação da apoptose em fígado, rins e baço de camundongos:

Grupos Experimentais	Fígado	Rim	Baço
	Média±EPM	Média±EPM	Média±EPM
C-	1,8±0,37 <sup>a</sup>	1,4±0,24 <sup>a</sup>	2,6±0,24 <sup>a</sup>
CP	18,0±0,70 <sup>d</sup>	18,0±0,63 <sup>c</sup>	19,2±1,02 <sup>c</sup>
Car-2,5	1,8±0,37 <sup>a</sup>	1,6±0,24 <sup>a</sup>	1,0±0,31 <sup>a</sup>
Car-5	1,8±0,20 <sup>a</sup>	2,0±0,31 <sup>a</sup>	1,0±0,44 <sup>a</sup>
Car-10	2,0±0,51 <sup>a</sup>	2,0±0,00 <sup>a</sup>	1,6±0,51 <sup>a</sup>
CP+Car-2,5	3,0±0,31 <sup>a,b</sup>	3,2±0,37 <sup>a</sup>	2,8±0,24 <sup>a</sup>
CP+Car-5	3,2±0,37 <sup>b</sup>	4,2±0,37 <sup>a</sup>	3,6±0,51 <sup>a</sup>
CP+Car-10	6,4±0,67 <sup>c</sup>	7,8±0,58 <sup>b</sup>	6,8±0,73 <sup>b</sup>

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey).

**Tabela 08** – Contagem diferencial de células do sangue periférico em camundongos:

Tipos celulares	Valores de referência	Grupos Experimentais							
		C-	CP	Car-2,5	Car-5	Car-10	CP+Car-2,5	CP+Car-5	CP+Car-10
<b>Linfócitos</b>	55-95%	73,2±1,98 <sup>b</sup>	66,6±4,92 <sup>a,b</sup>	73,8±4,75 <sup>b</sup>	66,4±3,80 <sup>a,b</sup>	66,6±4,36 <sup>a,b</sup>	47,8±7,10 <sup>a</sup>	63,6±2,73 <sup>a,b</sup>	65,8±6,36 <sup>a,b</sup>
<b>Neutrófilos</b>	10-40%	23,2±2,03 <sup>a</sup>	31,6±4,67 <sup>a,b</sup>	22,4±3,44 <sup>a</sup>	26,2±2,87 <sup>a</sup>	30,0±3,75 <sup>a,b</sup>	48,0±7,09 <sup>b</sup>	31,8±1,28 <sup>a,b</sup>	28,6±5,57 <sup>a,b</sup>
<b>Monócitos</b>	0,1-3,5%	1,20±0,49 <sup>a</sup>	0,40±0,24 <sup>a</sup>	2,60±0,74 <sup>a</sup>	5,20±1,85 <sup>a</sup>	2,60±1,21 <sup>a</sup>	3,20±0,80 <sup>a</sup>	3,20±0,97 <sup>a</sup>	4,20±1,35 <sup>a</sup>
<b>Eosinófilos</b>	0-0,4%	0,40±0,24 <sup>a</sup>	0,20±0,20 <sup>a</sup>	0,80±0,80 <sup>a</sup>	0,60±0,40 <sup>a</sup>	0,40±0,24 <sup>a</sup>	0,20±0,20 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,60±0,60 <sup>a</sup>
<b>Basófilos</b>	0-0,3%	0,40±0,24 <sup>a</sup>	0,40±0,24 <sup>a</sup>	0,40±0,24 <sup>a</sup>	2,00±1,76 <sup>a</sup>	1,00±1,00 <sup>a</sup>	1,00±0,54 <sup>a</sup>	1,40±1,40 <sup>a</sup>	0,80±0,58 <sup>a</sup>

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey).



CI 086/2013 – CEUA

De: Dra. Maria Araújo Teixeira  
Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS

Para: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira Oliveira

Data: 14.10.2013

Prezada Senhor:

Informamos para os devidos fins que a solicitação de autorização para ampliação/extensão de projetos anteriormente aprovados para o desenvolvimento de novo experimento (CI 41/2013- de 05.09.2013) dos Protocolos CEUA nº 399/2011, processo nº 23104.000615/2012-15 e protocolo nº 523/2013, processo nº 23104.005057/2013-65 do pesquisador Rodrigo Juliano Oliveira, referente aos projetos de pesquisa "Avaliação da atividade (anti)mutagênica, imunomodulatória, apoptótica e histopatológica dos lipídios resorcinólicos AMS-35AA, AMS-35BB e AMS-49 *in vivo* " e Avaliação da atividade bioquímica e hematológica dos lipídios resorcinólicos AMS-49, AMS-35AA e AMS-35BB, respectivamente, foram encaminhados à CEUA/UFMS e, após análise sob os preceitos éticos e legais vigentes, autoriza as ampliações/extensões acima solicitadas, após constatação de que trata-se de um mesmo assunto, com a mesma metodologia. Mudando somente os lipídios resorcinólicos a serem avaliados (AMS37, Cardanol, – óleos sintetizados a partir da *Acrocomia aculeata* -, RJ07, RJ14, DRF-2 e enol-lactona). Passando os protocolos CEUA/UFMS 399/2012 e 523/2013 a serem acrescidos, respectivamente, de 480 camundongos *Swiss* machos, com peso médio de 30 gramas. E a utilização destes animais terá início em janeiro de 2014 e a finalização do projeto de pesquisa será em novembro de 2015.

Sendo o que se apresenta para o momento, apresentamos a Vossa Senhoria nossas atenciosas saudações.

Maria Araújo Teixeira  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UFMS

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Cidade Universitária – Caixa Postal 549  
Fone: (67) 3345-7187; ceua@propp.ufms.br  
70070-900 – Campo Grande - MS