UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO DA REGIÃO CENTRO-OESTE

SARA MONALISA DE ALENCAR LIMEIRAS

EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Moquiniastrum polymorphum* SOBRE A CARCINOGÊNESE COLORRETAL INDUZIDA PELA 1,2 DIMETILHIDRAZINA.

Campo Grande
2016

SARA MONALISA DE ALENCAR LIMEIRAS

EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Moquiniastrum polymorphum* SOBRE A CARCINOGÊNESE COLORRETAL INDUZIDA PELA 1,2 DIMETILHIDRAZINA.

Defesa apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira.

Campo Grande

2016

SARA MONALISA DE ALENCAR LIMEIRAS

EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Moquiniastrum polymorphum* SOBRE A CARCINOGÊNESE COLORRETAL INDUZIDA PELA 1,2 DIMETILHIDRAZINA.

Defesa apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira.

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o conceito _____

Campo Grande, 03 de agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA	**CONCEITO**
_____	_____
Rodrigo Juliano Oliveira – FAMED/UFMS	
_____	_____
Mônica Cristina Toffoli Kadri – CCBS/UFMS	
_____	_____
Andréa Luiza Cunha Laura – CCBS/UFMS	
_____	_____
Rita de Cássia Avellaneda Guimarães – CCBS/UFMS	

Dedico este trabalho à minha mãe **Mari Alencar** e à minha tia **Gorete**, que sempre se mantiveram presentes, apesar da distância.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, sem Ti nada seria e nada faria. O conhecimento não é meu, é Seu. Obrigada Senhor pela vida e pela oportunidade.

Agradeço à minha família, minha base, minha fonte de amor e conforto.

Agradeço à Ste, Pam, Nath e Mayra, obrigada por me acolherem assim que cheguei aqui em Campo Grande, vocês foram minhas primeiras amigas aqui e da mesma forma que abriram as portas para mim, as portas da minha casa sempre estarão abertas para vocês.

Agradeço aos amigos do laboratório que tanto me auxiliaram: Fabrícia, Cláudia, Juliana, Nathan, Raíssa, Gabi, Jons, Lucas, Leal, Pedro, Bárbara, Michel e Renata. Cada um de vocês cedeu um tempo da vida de vocês para que o meu trabalho pudesse ser realizado, seja passando dias fazendo experimentos comigo no Biocapri, seja numa troca de conhecimento, seja numa conversa. Independente de como foi, podem ter certeza que serei eternamente agradecida.

Á minha co-autora Bea, que tanto me auxiliou na parte experimental, amiga, obrigada, com você aprendi na prática o sentido de parceria.

O mestrado me rendeu mais do que trabalho e título, me rendeu algumas amizades que espero levar para toda vida: Thayana, Naiara e Ana, vocês foram o que aconteceu de mais importante nessa fase da minha vida.

Agradeço às técnicas Rose e Ana, por todo o auxílio prestado e por sempre ajudarem com boa disposição.

Obrigada Professor Monreal por ceder o Biocapri para que o experimento pudesse ser realizado.

Agradeço às professoras Mônica, Karine, Andréa e Rita pela contribuição nesse trabalho.

Agradeço a Secretaria do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, em especial à Áurea e à Vera, por sempre me auxiliarem em tudo o que eu precisei relacionado à pós-graduação, vocês foram super queridas, obrigada.

Ao meu orientador Rodrigo Juliano, obrigada pela oportunidade e pelo apoio.

Agradeço à FUNDECT e CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

Deixo aqui minha gratidão a todos os animais utilizados em prol da pesquisa.

Obrigada!

“Buscai em primeiro lugar o reino de Deus e sua justiça, e todas as outras coisas vos serão acrescentadas”.

(Mateus 6:33)

RESUMO

Limeiras, Sara Monalisa de Alencar. **Efeito do extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* sobre a carcinogênese colorretal induzida por 1,2 dimetilhidrazina.** 2016. 63 p. Dissertação de Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Esse estudo avaliou o extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* (EEMP) sobre a carcinogênese colorretal induzida por 1,2 dimetilhidrazina (DMH). Foram utilizados 42 camundongos machos *swiss* (*Mus musculus*) distribuídos em seis grupos experimentais (n=7/grupo): controle, DMH, EEMP, pré-tratamento, simultâneo e pós-tratamento. Os resultados indicaram que o EEMP é antigenotóxico, pois as porcentagens de redução de danos (% RD), no ensaio do cometa, tiveram valores acima de 81% nos grupos associados. Também demonstrou atividade antimutagênica, pois no teste do micronúcleo as % RD foram superiores à 77,09% nos grupos associados. O teste de focos de criptas aberrantes demonstrou o elevado potencial anticarcinogênico do EEMP, pois os grupos associados apresentaram % RD de 62,13%; 86,40% e 95,14% para o pré-tratamento, simultâneo e pós-tratamento, respectivamente. O estudo demonstra que EEMP não causa toxicidade e possui atividade quimiopreventiva e anticarcinogênica, sendo que pode vir a ser um promissor fitoterápico devido às propriedades demonstradas nesse trabalho.

Palavras-chave: Anticarcinógenos, cometa, testes para micronúcleos, fagocitose, foco de cripta aberrante, cambará.

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of the *Moquiniastrum polymorphum* ethanol extract (MPEE) on 1.2 dimethylhydrazine (DMH)-induced colorectal carcinogenesis. Forty-two male Swiss mice (*Mus musculus*) were distributed into six groups (n=7/group): control, DMH, EEMP, pre-treatment, simultaneous and post-treatment. The findings indicated that the EEMP is antigenotoxic because the damage reduction percentages (DR%) through the comet assay were more than 81% in the associated groups. The agent also showed antimutagenic activity, because the micronucleus test found DR% higher than 77.09 in the associated groups. The aberrant crypts foci test demonstrated the high anticarcinogenic potential of the MPEE as the associated groups showed DR% 62.13, 86.40 and 95.14 for pre-treatment, simultaneous and post-treatment groups, respectively. The study shows that the MPEE in nontoxic and has chemopreventive and anticarcinogenic activity, thus the agent may prove to be a promising herbal medicine in view of its demonstrated properties.

Keywords: Anticarcinogenicity, Comet assay, Micronucleus assay, Phagocytosis, Aberrant crypt focus, cambara.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Proto-oncogenes, genes supressores tumorais e a regulação do ciclo celular. 16
Figura 2 - Biotransformação da 1,2 dimetilhidrazina.....18
Figura 3 – Delineamento experimental 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios ± erro padrão da média do peso inicial, peso final e ganho de peso dos animais durante o período experimental 37
Tabela 2 - Valores médios ± erro padrão da média do peso absoluto dos órgãos dos animais após o período de experimentação.....38
Tabela 3 - Valores médios ± erro padrão da média do peso relativo dos órgãos dos animais após o período de experimentação.....39
Tabela 4 - Valores médios ± erro padrão da média da freqüência de células lesionadas, distribuição entre as classes de danos e score referentes aos testes de genotoxicidade e antigenotoxicidade do extrato etanólico de Moquiniastrum polymorphum no ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos machos. 41
Tabela 5 - Freqüência total, valores médios ± erro padrão da média e porcentagem de redução de danos referentes aos testes de mutagenicidade e antimutagenicidade no ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos tratados com extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* 42
Tabela 6 - Número total, freqüência média ± erro padrão da média (EPM) e porcentagem de células com ou sem evidência de fagocitose esplênica em camundongos tratados com extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum*. 44
Tabela 7 - Número, distribuição e redução de danos de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) no cólon de camundongos tratados com extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* 46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

2. REVISÃO DA LITERATURA 15

2.1 Câncer 15

2.2 Câncer de cólon e reto 17

2.3 Carcinogênese experimental 17

2.4 Quimioprevenção 19

2.5 Produtos naturais 20

2.5.1 *Moquiniastrum polymorphum* **..... 20**

2.6 Ensaios biológicos 21

2.6.1 Ensaio do Cometa 21

2.6.2 Ensaio do Micronúcleo 23

2.6.3 Ensaio de Fagocitose esplênica 25

2.6.4 Focos de criptas aberrantes 26

3. OBJETIVOS 29

3.1 Objetivo geral 29

3.2 Objetivos específicos 29

4. MATERIAL E MÉTODO 30

4.1 Câncer 30

4.1.1 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) 30

4.1.2 Coleta e identificação do material botânico 30

4.1.3 Preparação do extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* (EEMP) 30

4.2 Animais 31

4.3 Delineamento experimental 31

4.4 Ensaios Biológicos 33

4.4.1 Ensaio do Cometa 33

4.4.2 Ensaio do Micronúcleo 34

4.4.3 Fagocitose esplênica 34

4.4.4 Teste de Focos de Criptas Aberrantes (FCA) 35

5. RESULTADOS 36

5.1 Parâmetros Biométricos 36

5.2 Integridade genética e prevenção de danos no DNA 40

5.3 Fagocitose esplênica 43
5.4 Redução da formação de focos de criptas aberrantes 45
6. DISCUSSÃO.....47
7. CONCLUSÃO.....50
REFERÊNCIAS.....51
ANEXO 1.....63

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a World Health Organization (WHO), estima-se que atualmente existem 14 milhões de pessoas com câncer no mundo e que 8,2 milhões de pessoas morrerão anualmente em consequência dessa doença (WHO, 2012).

Os dados na literatura mostram que há relação entre o câncer e a inflamação (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; DINIZ, 2012; HU et al., 2015). Entre os cânceres induzidos por inflamação, destaca-se o câncer colorretal que é a terceira neoplasia maligna mais comum e a quarta maior responsável por mortalidade (LABIANCA et al., 2013). Sua incidência é prevalente em países industrializados e ocidentais, e está crescendo em países asiáticos, onde historicamente o risco da doença era baixo (WEST et al., 2012; ACSCC, 2016).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) calcula-se 34.280 novos casos de câncer colorretal no Brasil para o ano de 2016. Esses dados demonstram alta prevalência dessa doença o que estimula estudos que correlacionem a biodiversidade de plantas desse país e os conhecimentos etnobotânicos na prospecção de novos compostos anticâncer (INCA, 2016).

Moquiniastrum polymorphum, anteriormente identificada como *Gochnatia polymorpha*, pertence à família Asteraceae e é denominada popularmente por cambará (DAVID et al., 2014). Estudos indicam que essa planta é rica em lactonas sesquiterpênicas, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, cumarinas, compostos fenólicos e óleos essenciais (STRAPASSON et al., 2014).

As folhas, flores e cascas do cambará são amplamente utilizadas na medicina popular, na forma de infusão, principalmente para o tratamento de inflamação e infecções do trato respiratório (GARLET; IRGANG, 2000; BUENO et al., 2005; ARAMBARRI et al., 2008). Já foi relatado também a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico do caule dessa mesma planta, bem como do composto isolado 11,13-dihydrozaluzanin C em camundongos *Swiss* (PIONERDO et al., 2011). Posteriormente foi também demonstrado em camundongos fêmeas *Swiss* que esse mesmo extrato não é mutagênico e nem teratogênico, por meio do ensaio de micronúcleo e da ausência de embriotoxicidade em camundongos fêmeas prenhes, além de demonstrar eficiente atividade anti-inflamatória por meio do ensaio de edema de pata induzido por adjuvante completo de Freund (CFA) (DAVID et al., 2014). Por fim nosso grupo descreveu a atividade antineoplásica desse extrato,

frações e compostos isolados tanto em sistema-teste *in vitro* (STRAPASSON et al., 2012) quanto *in vivo* (MARTINS et al., 2015). Dos ensaios *in vivo* destaca-se que a fração diclorometano dessa planta medicinal é capaz de reduzir o crescimento de carcinosarcoma Walker-256 (MARTINS et al., 2015).

Diante do exposto o presente estudo avaliou o efeito do extrato etanólico da casca de *Moquiniastrum polymorphum* quanto a sua ação sobre a integridade genética, fagocitose esplênica e capacidade de inibir a formação de focos de criptas aberrante na mucosa intestinal de camundongos machos *Swiss*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

Nos próximos 20 anos, estima-se o surgimento de 22 milhões de novos casos de câncer no mundo e o número de mortes causadas por essa doença deve atingir 14 milhões óbitos por ano (WHO, 2012). No Brasil, a estimativa para o ano de 2016, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, dentre esses casos estimam-se 16.660 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e de 17.620 em mulheres (INCA, 2016).

Câncer é o nome dado a um amplo conjunto de doenças que têm em comum o crescimento descontrolado de células transformadas e que podem invadir todos os tecidos e órgãos por meio das metástases, prejudicando suas funções básicas. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células de onde se originam, a velocidade de crescimento da massa tumoral, a capacidade de invasão e ao tipo de mutação que dá origem a transformação (CÔRREA, 2005). Em geral, as mutações são responsáveis pela ativação de proto-oncogenes e/ou inativação de genes supressores tumorais (AMES et al., 1973; VOGEL, 1982; McKELVEY-MARTIN et al., 1998).

Em suas configurações normais, os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais, coreografam o ciclo celular em uma intrincada sequência de eventos pelos quais as células crescem e se dividem, desta forma, estas duas classes de genes são responsáveis pela proliferação descontrolada em vários tipos de cânceres humanos (WEINBERG, 1996). Assim, a regulação normal e equilíbrio entre apoptose e a proliferação celular é desviada para um estado proliferativo descontrolado com perda da morte celular (BERG; SOREIDE, 2011).

Os proto-oncogenes são genes que estão envolvidos em funções celulares normais. Mas, que são equivalentes a oncogenes carregados por alguns retrovírus. Em certos casos, mutações ou a ativação aberrante dos mesmos, na célula, está associada à formação de tumores. A ativação de um oncogene representa um evento de ganho de função, no qual um proto-oncogene celular é ativado inapropriadamente. Isto pode envolver uma modificação mutacional da proteína, uma ativação constitutiva da expressão do gene, a sua superexpressão ou a falha na inativação da sua expressão no momento adequado (LEWIN, 2001).

Os supressores tumorais são inativados por deleções ou outras mutações que são tumorigênicas. A evidência mais convincente da natureza destes genes é fornecida por certos cânceres hereditários, que se desenvolvem em pacientes que perderam ambos os alelos e, portanto, não possuem um gene ativo. Uma mutação em um supressor pode representar uma perda de função em genes que normalmente impõem alguns limites ao ciclo celular ou ao crescimento celular (LEWIN, 2001).

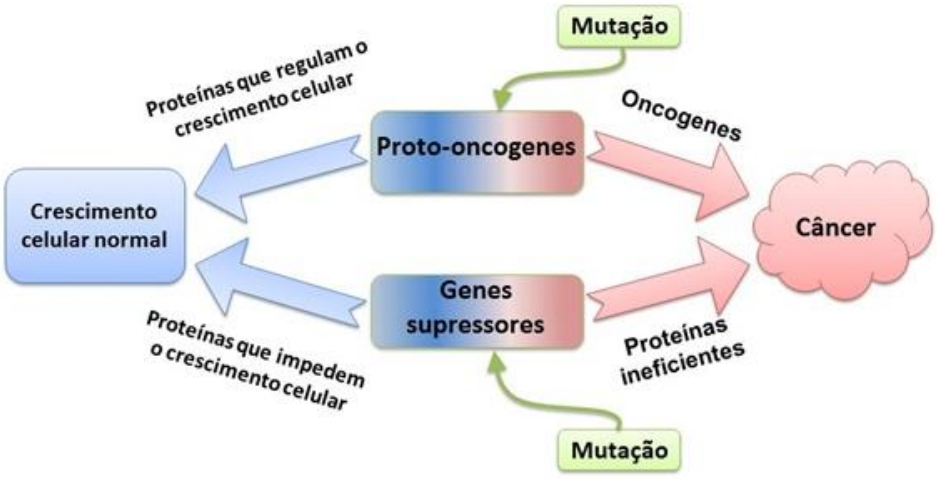

Figura 1- Proto-oncogenes, genes supressores tumorais e a regulação do ciclo celular.
Fonte: http://biologiadiversa.blogspot.com.br/2013_06_01_archive.html

Segundo Pitot (1989) o processo carcinogênico se divide em quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e manifestação. Essas etapas começam primeiramente com a iniciação que se dá por uma interação entre o agente cancerígeno e o DNA, levando ao dano no DNA a cada final de ciclo da divisão celular. Após esta etapa a promoção ocorre expressando fenotipicamente a mutação anteriormente induzida, estimulando a proliferação celular (PITOT; DRAGAN, 1991; PITOT, 1993; WARGOVICH; PUREWAL, 1995). Já na progressão há a manifestação histológica, o que revela a instabilidade do genoma. Estas alterações estão intimamente ligadas à última etapa, a manifestação, onde ocorre intensa proliferação celular, invasão e várias alterações bioquímicas (PITOT, 1989; WARGOVICH; PUREWAL, 1995). Resumindo, o processo de carcinogênese se inicia quando ocorre o desarranjo dos processos celulares que controlam a divisão celular e apoptose (WCRF, 2007).

2.2 Câncer de cólon e reto

O câncer do cólon e reto surge devido a alterações genéticas e epigenéticas no epitélio do cólon (HUMPHRIES; WRIGHT, 2008). De acordo com o INCA (2016), o câncer colorretal abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto. É tratável e, na maioria dos casos, curável se detectado precocemente, quando ainda não se espalhou para outros órgãos. Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso. Uma maneira de prevenir o aparecimento dos tumores seria a detecção e a remoção dos pólipos antes de eles se tornarem malignos.

2.3 Carcinogênese experimental

Modelos experimentais com a utilização de cancerígenos químicos são adotados para estudar aspectos da carcinogênese do cólon que não podem ser analisados em seres humanos. Os estudos experimentais permitem a observação detalhada das alterações que precedem o aparecimento da neoplasia maligna em nível histológico (CHANG, 1986; MAYER et al., 1987).

Em 1967, Druckrey e cols. demonstraram que a administração parenteral de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) resultou no desenvolvimento de câncer, tanto no intestino delgado quanto no cólon de ratos. Todos os animais desenvolveram neoplasias e o cancerígeno mostrou-se seletivo em seus efeitos, pois foram encontradas somente neoplasias intestinais. A partir de então, a DMH tem sido amplamente utilizada em pesquisas de carcinogênese do cólon para o estudo de vários aspectos da morfologia, patogênese, prevenção e tratamento (MARTIN et al., 1973; SUNTER et al., 1978; SEQUEIRA, 1997), sendo o melhor modelo experimental para avaliar o potencial de um agente quimiopreventivo (CORPET; PIERRE, 2005).

A DMH é classificada como um pró-carcinógeno, ou seja, necessita de ativação metabólica para tornar-se um carcinógeno ativo (LAMONT; O'GORMAN, 1978), e a ativação ocorre principalmente no fígado, havendo oxidação da DMH a azometano e posteriormente em azoximetano, que por sua vez, é N-hidroxilado a metilazoximetanol (WEISBURGER, 1971; FIALA, 1975; LAMONT; O'GORMAN, 1978).

No fígado o metilazoximetanol é conjugado com o ácido β-glicurônico, e levado até a luz intestinal, onde a β-glicuronidase bacteriana libera o metabólito ativo da DMH, o azoximetano (LAMONT; O'GORMAN, 1978).

À temperatura corporal, o metilazoximetanol é um composto instável, que sofre decomposição de forma espontânea, dando origem ao formaldeído, água, nitrogênio e metildiazônio, sendo este um agente alquilante que apresenta um íon carbônico reativo, que apresenta capacidade de reagir com DNA, RNA ou proteínas (WEISBURGER, 1971; NAGASAWA; SHIROTA; MATSUMOTO, 1978). A ação carcinogênica da DMH envolve, portanto, a metilação do DNA em células epiteliais colônicas (HAWKS et al., 1974).

O metilazoximetanol também sofre metabolização enzimática, pela ação da enzima álcool desidrogenase (que está presente no fígado e cólon e em baixas concentrações no jejuno e íleo), convertendo esse em metilazoxiformaldeído (GRAB; ZEDEK, 1977).

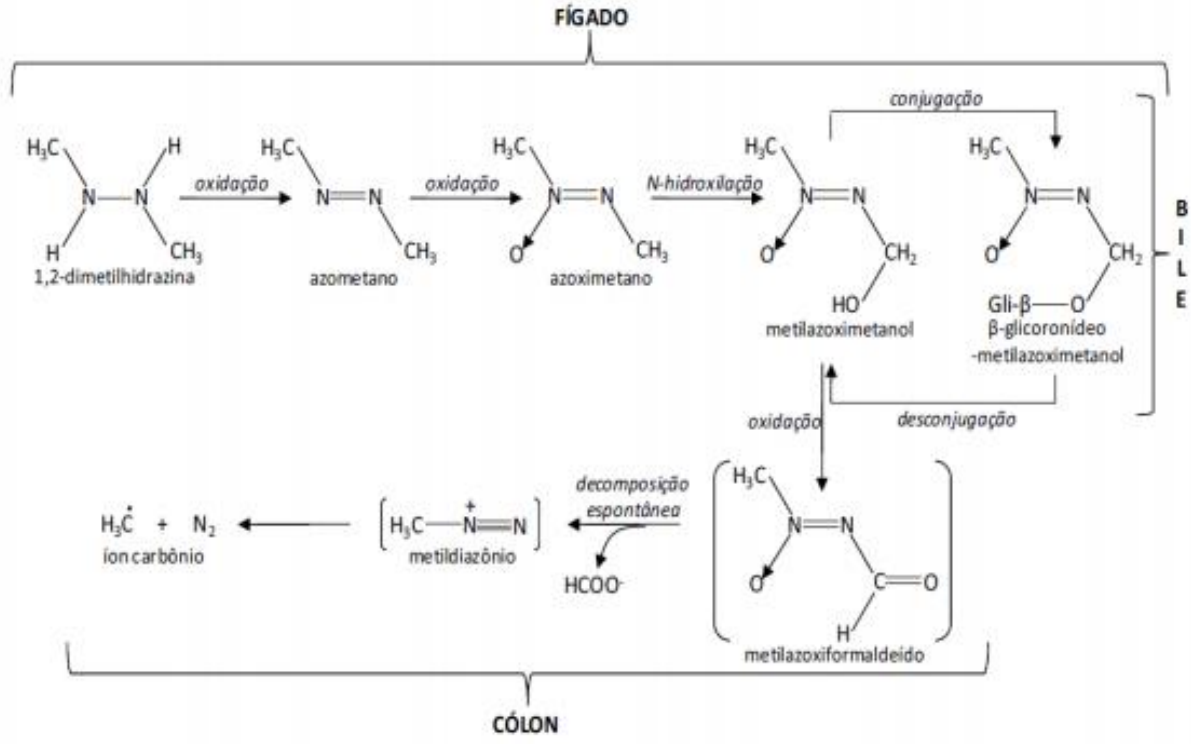

Figura 2 – Biotransformação da 1,2 dimetilhidrazina.
Fonte: Adaptado de Weisburger, 1971.

Em roedores a administração da DMH desencadeia uma reação inflamatória leve e um aumento da proliferação celular na mucosa do cólon (KRUTOVSKIKH; TUROSOV, 1994). Sua aplicação sucessiva resulta na proliferação contínua, havendo um aumento do número de células em fase de síntese de DNA (DESCHNER, 1978; WARGOVICH et al., 1983) e, dessa forma a uma hiperplasia progressiva das criptas e hipertrofia da mucosa (WIEBECKE; KREY; LÖHRS, 1973; RICHARDS, 1977). A DMH tem sido então mostrada como a causa de danos na síntese de DNA, resultando em uma lesão pró-mutagênica na O^6–metilguanina que induz transições GC → AT, e tais mutações são tipicamente encontradas em vários genes ligados ao câncer colorretal (KRUTOVSKIKH; TUROSOV, 1994. DIEHL, 2006). Estas mudanças genéticas no processo de desenvolvimento de malignidade na mucosa colorretal incluem o envolvimento dos genes APC, TP53, *K-ras* e *β-catenina* (CHENG; LAI, 2003).

2.4 Quimioprevenção

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter as etapas iniciais do processo de desenvolvimento de neoplasias (KURODA; HARA, 1999; KELLOFF et al., 2000; NAMASIVAYAM, 2011). A quimioprevenção seria a capacidade de alguns agentes modularem a mutagenicidade e/ou a carcinogênese. Quando estas agem interferindo sobre a mutagênese, são considerados antimutagênicos e quando interferem nos processos da carcinogênese, de anticarcinogênicos (DASHWOOD, 2002).

Dentre os estudos da área de mutagênese o potencial quimiopreventivo de uma substância é testado confrontando o suposto antimutagênico com uma substância sabidamente mutagênica, e então se deve observar uma redução das lesões produzidas no DNA (LUIZ, 2002).

2.5 Produtos naturais

Os produtos naturais e seus derivados representam cerca de 50%-80% de todas os fármacos de uso clínico no mundo (PETROVSKA, 2012; SEN; SAMANTA, 2015).

Os fitoterápicos, medicamentos industrializados constituídos exclusivamente de material vegetal padronizado, também são detentores de um mercado extremamente lucrativo, de tal forma que renova o interesse das grandes indústrias farmacêuticas por esse segmento. (BOLDI, 2004; KOEHN; CARTER, 2005). A produção de medicamentos fitoterápicos é um emprego importante da biodiversidade. Esses medicamentos constituem-se em preparações contendo extratos padronizados de uma ou mais plantas, hoje amplamente comercializados em países pobres ou ricos (CALIXTO, 2003).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define medicamentos fitoterápicos na RDC nº 26/2014 (que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.), no artigo 2º, parágrafo 2º no qual diz: “São considerados produtos tradicionais fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização” (BRASIL, 2014).

Sendo assim, é de vital importância que sejam realizados estudos no intuito de estabelecer possíveis propriedades farmacológicas e toxicológicas dos mais diversos gêneros e espécies de plantas utilizadas na medicina popular brasileira, subsidiando, assim, o emprego dos extratos ou frações dessas plantas como fitoterápico e também no intuito de isolar novos metabólitos secundários biologicamente ativos que possam ser aplicados futuramente na prática clínica ou em pesquisas (PIONERDO, 2011).

2.5.1 *Moquiniastrum polymorphum* ou Cambará

A planta *Moquiniastrum polymorphum*, popularmente conhecida como Cambará, pertence à família Asteraceae, também conhecida como Compositae.

Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica (VERDI et al., 2005).

Asteraceae é a maior família do grupo das Angiospermas (plantas floríferas), compreendendo cerca de 1.600 gêneros e 24.000 espécies. O grande número de espécies e a diversidade morfológica das Asteracea sempre foram um desafio para os taxonomistas (FUNK, 2009).

Ao longo do tempo várias classificações foram propostas para as espécies da família. O advento da biologia molecular trouxe mudanças na circunscrição dos gêneros, tribos e subfamílias de Asteraceae, agora baseada em dados genéticos (PANERO; FUNK, 2008).

O gênero *Gochnatia* foi um dos que sofreram alterações. Na década de 70, uma revisão das espécies da tribo *Gochnatinae* levou a redefinição do gênero *Gochnatia*, o qual passou a incluir espécies anteriormente classificadas nos gêneros *Moquinia* e *Spadonia*. Nessa classificação o gênero agrupava 70 espécies em seis seções, sendo uma delas denominada *Moquiniastrum*. Estudos recentes de filogenia molecular mostraram que as espécies da seção *Moquiniastrum* eram muito próximas entre si e, diferentes das demais espécies do gênero, o que determinou a sua elevação ao nível de gênero (CABRERA, KLEIN, 1973; SANCHO et al., 2013). A espécie *M. polymorpha* tem uma ampla área de distribuição, sendo encontrada nas regiões de Mata Atlântica desde o Nordeste até o Rio Grande do Sul, e também no Paraguai. A subespécie *ceanothifolia* ocorre no estado do Rio Grande do Sul e também no Uruguai, Paraguai e nordeste da Argentina. A subespécie *floccosa* é exclusiva do Brasil, sendo encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SANCHO; FUNK; ROQUE, 2013).

Falcão e cols. (2005) verificaram que os extratos das folhas de *M. polymorphum* possuem atividade anti-inflamatória. Em um estudo posterior, Stefanello e cols. (2006) em experimento com extratos da casca, concluíram que o cambará pode ter aplicação terapêutica em doenças causadas por bactérias Gram-positivas.

2.6 Ensaios biológicos

2.6.1 Ensaio do Cometa

Os agentes genotóxicos são capazes de interagir quimicamente com o material genético, provocando adutos, alterações oxidativas ou mesmo quebrando a molécula de DNA (MÍDIO; MARTINS, 2000). Normalmente as células podem reparar lesões no DNA por meio de diferentes processos. Caso a reparação não aconteça adequadamente, estas podem ser eliminadas por processos de morte celular e/ou sequestradas por células do sistema de defesa ou pelo baço. O DNA danificado e não reparado, origina as mutações, que pode originar defeitos na transcrição e replicação da molécula, provocando fenótipos diversos (KORNHAUSER; WAMER; LAMBERT, 1991). Efeitos genotóxicos podem se manifestar mesmo em concentrações muito baixas de substâncias, podendo refletir na reprodução, vida embrionária, desenvolvimento, crescimento e sobrevivência de organismos. Podem ter ainda relação com a carcinogênese, defeitos hereditários por mutações, teratogênese e doenças de fundo genético (DI PAOLO, 2006).

Dentre as metodologias utilizadas para avaliar danos no DNA, o ensaio cometa destaca-se devido sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas sendo extensivamente utilizado para detecção de genotoxicidade (KAMMANN et al., 2001). A maior vantagem do ensaio cometa é sua alta sensibilidade a vários tipos de danos no DNA (BÜCKER et al., 2006), além de possuir custo relativamente baixo, ser um método rápido, preciso e possuir boa reprodutibilidade (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). Outras vantagens incluem a detecção de danos em células individuais, o baixo número de células necessário para a realização do ensaio e o fato de poder ser realizado com qualquer tipo de célula eucariótica (LEE; STEINERT, 2003).

Os primeiros pesquisadores a utilizar a quantificação direta do DNA em células individuais foram Rydberg e Johanson em 1978. Em 1984, Östling e Johanson realizaram modificações nessa técnica, em que células embebidas em agarose, individualizadas, eram depositadas sobre uma lâmina de microscópio, lisada por detergentes e altas concentrações de sais e em seguida expostas à microeletroforese em condições neutras. As células que apresentaram uma maior incidência de quebras de cadeia dupla de DNA tinham em direção ao ânodo, uma maior migração do DNA, característica que permite a visualização de uma “cauda”, ao exame microscópico, após coloração com brometo de etídeo, um agente intercalante. Devido à aparência resultante da eletroforese essa técnica foi chamada de cometa. Desta forma, Olive (1989) sugeriu o nome *Comet Assay* (ensaio cometa)

para identificação do teste, também conhecido por *Single Cell Gel Electrophoresis Assay* (SCGE).

Assim sendo só é possível a visualização de células lesionadas (com cauda) ou não, devido à metodologia na qual as células, englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do nucleóide. Após a eletroforese, as células que apresentam um nucleóide redondo são identificadas como normais, sem danos detectáveis no DNA. Por outro lado, as células lesionadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA após a corrida eletroforética. Estes fragmentos podem se apresentar de diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao nucleóide por uma cadeia simples. Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas é de consenso que a simples visualização do cometa já significa que danos estão presentes no DNA, podendo ser quebras de fita simples, duplas, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis (SILVA, 2007).

Um fator limitante do teste é o uso de condições neutras para a eletroforese, que permite apenas a detecção de quebras de cadeia dupla de DNA. Como solução a essa limitação, foi então proposto que a eletroforese fosse realizada em condições alcalinas (pH >13) e dessa forma permite detecção de sítios álcali-lábeis no DNA e de quebras de fitas simples (SINGH et al., 1998, TICE, 1995; BRIANEZI et al., 2009).

O ensaio do cometa alcalino é a técnica mais sensível para analisar a cinética de reparação do DNA *in vivo* em células não proliferativas. Essa metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão (SILVA, 2007).

2.6.2 Ensaio do Micronúcleo

Agentes físicos e químicos podem induzir aberrações cromossômicas por meio de diferentes mecanismos, envolvendo danos clastogênicos e aneugênicos. O dano clastogênico é caracterizado pela indução da quebra cromossômica durante a divisão celular, enquanto o dano aneugênico compreende a inativação da estrutura

celular, induzindo as perdas cromossômicas por falhas na formação do fuso mitótico (FENECH, 2000).

Diante desses conhecimentos e da necessidade de um teste que detecte agentes clastogênicos (que induzem a quebra cromossômica) e aneugênicos (que induzem a aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) é muito utilizado o teste do micronúcleo (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003), que além de possuir tal sensibilidade, é um teste de curta duração e por isso pode ser executado em um curto espaço de tempo e sem grandes investimentos.

Esse teste tornou-se viável e confiável na década de 70, pelo estudo de eritrócitos policromáticos da medula óssea em camundongos, passando a ser um dos mais úteis indicadores de dano citogenético na medula óssea (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975).

Para que se compreenda sua morfologia, relata-se que os micronúcleos são estruturas presentes no citoplasma de células em divisão, que possuem características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal quando avaliados ao microscópio óptico (GATTÁS et al., 1992), isso porque os micronúcleos resultam de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, presentes no citoplasma das células, produto de lesões causadas por agentes mutagênicos (GALINDO; MOREIRA, 2009) que atuam fazendo com que os cromossomos se atrasem durante a anáfase do ciclo celular (FENECH, 2000; GATTÁS, 2001) e não sejam incorporados ao núcleo da célula filha durante a mitose, freqüentemente, porque estes fragmentos não possuem um centrômero (SCHMID, 1975; HEDDLE, 1973).

Os ensaios *in vivo* e *in vitro* são internacionalmente aceitos como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico ou antimutagênico de novos produtos. No entanto, a versão *in vivo* é a mais utilizada (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

In vivo, sugere-se que os micronúcleos sejam avaliados em hemácias jovens, pois quando os eritroblastos expelem seus núcleos e se transformam em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma, onde são facilmente identificados devido à sua morfologia arredondada e coloração características. No entanto, Hayashi e cols. (1990) descreveram a técnica de micronúcleo em sangue periférico utilizando a coloração laranja de acridina. Este corante ao se intercalar com moléculas de DNA e após ser submetido à radiação ultravioleta emite uma fluorescência de cor amarela. Já quando se liga ao RNA, sem a capacidade de se

intercalar, a fluorescência emitida é vermelha. Essas propriedades permitem a identificação dos reticulócitos, eritrócitos jovens ricos em RNA em nível citoplasmático, que se coram em vermelho pela presença desse ácido nucléico. Os micronúcleos que por sua vez possuem DNA em sua constituição coram-se em amarelo e se encontram no meio ou nas bordas das regiões coradas em vermelho.

As vantagens apresentadas pelo teste do micronúcleo, segundo Sato e Tomita (2001) são: (I) subjetividade reduzida na análise; (II) simplicidade; (III) rapidez; (IV) uso de pequena amostra de sangue, permitindo determinar o melhor tempo de amostragem; (V) a classificação de reticulócitos, pela quantificação do material fluorescente vermelho; (VI) os animais não precisam ser submetidos à eutanásia, podendo esse ensaio ser conduzido concomitantemente com estudos de toxicidade ou carcinogenicidade.

2.6.3 Ensaio de Fagocitose esplênica

O baço pode ser definido como a maior massa de tecido linfático do organismo (BANKS, 1992). Ele produz linfócitos e monócitos, fagocita partículas estranhas, bactérias, vírus e leucócitos, além de produzir e processar fatores séricos (opsoninas) com grande habilidade para a estimulação da fagocitose (SABA, 1970; HOSEA et al., 1981). O parênquima deste órgão é constituído por 55% de linfócitos B, situados nos corpúsculos esplênicos da polpa branca e por 45% de linfócitos T, localizados nas bainhas linfáticas periarteriais da mesma (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A polpa branca do baço é formada por tecido linfático denso e corpúsculos esplênicos distribuídos ao longo do percurso de suas artérias, intercalados com as bainhas linfáticas periarteriais. Os nódulos primários não têm centros germinativos, enquanto os secundários são imunologicamente competentes, formados pelo centro germinativo e pela coroa externa. O centro germinativo contém linfócitos maduros, linfoblastos, plasmócitos, células dendríticas e macrófagos. Conforme os linfócitos são produzidos, eles migram perifericamente para formar a coroa do nódulo. Uma arteríola, chamada de arteríola central, ocupa a região central ou paracentral dos nódulos. Entre as polpas branca e vermelha, localiza-se a zona marginal que consiste de seios, uma lâmina de células dendríticas, macrófagos e uma camada de células linfáticas. As bainhas linfáticas periarteriais e a zona marginal são regiões

timo dependentes ocupadas pelas células T, secretoras de interleucinas, enquanto os corpúsculos esplênicos produzem células B (BANKS, 1992). A região entre os corpúsculos esplênicos e as trabéculas refere-se à polpa vermelha, formada por seios e cordões esplênicos (cordões de Billroth), constituídos por uma rede frouxa de células e fibras reticulares que contém macrófagos, linfócitos B e T, plasmócitos, monócitos, leucócitos granulócitos, plaquetas e eritrócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O intenso fluxo sanguíneo que circula pelo baço permite aos macrófagos esplênicos filtrarem materiais estranhos, solúveis ou particulados, da corrente sanguínea e em função da extrema proximidade com grande número de linfócitos desencadeia e amplia a resposta imune a este material filtrado (BOHNSACK; BROWN, 1986).

2.6.4 Ensaio de focos de criptas aberrantes (FCA)

As criptas aberrantes foram primeiramente descritas por Bird (1987) no cólon de roedores tratados com cancerígenos químicos e, posteriormente em humanos, por Pretlow e cols. (1991), no cólon de pacientes portadores de adenocarcinomas

As criptas aberrantes podem ser identificadas na mucosa do cólon, como únicas ou na forma de focos, sendo designados de FCA (TUDEK; BIRD; BRUCE, 1989). Os FCA são observados com maior frequência no cólon médio e distal, tanto em roedores como no homem (DI GREGORIO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2002). E desde quando reportados em camundongos por Bird (1987), os FCA representam lesões no cólon, as quais são capazes de progredir para câncer de cólon/reto (STEVENS et al., 2007). Desta forma, os FCA são conjuntos de criptas do cólon/reto com morfologia anormal sendo o biomarcador mais utilizado para esse tipo de neoplasia e tem validação para uso experimental além de ser um importante prognóstico em estudos clínicos nos quais pode inclusive determinar intervenções cirúrgicas (STEVENS et al., 2007).

Na rotina experimental, a observação desses pré-pólipos é feita por meio do uso do azul de metileno em microscópio. A identificação é caracterizada pela presença de criptas aberrantes que apresentam abertura lumial mais larga, camada de células mais espessas se comparada a criptas normais e são usualmente agrupadas em focos (CHENG et al., 2003).

Em roedores, as criptas aberrantes são induzidas por compostos químicos genotóxicos e não genotóxicos (MCLELLAN; BIRD, 1988[a], MCLELLAN; BIRD, 1988[b]; BIRD, 1995; WHITELEY et al., 1996). Os cancerígenos químicos mais utilizados para a indução de FCA no cólon de roedores são a DMH e seu metabólito, o azoximetano (RODRIGUES et al., 2002). Na mucosa do cólon de animais tratados com cancerígenos químicos, as criptas aberrantes são revestidas por células epiteliais com diferentes graus de maturação celular e displasia (BIRD, 1995). Do ponto de vista experimental, a análise de FCA é fundamental para se investigar alterações moleculares muito precoces na carcinogênese do cólon (OCHIAI et al., 2003; STEVENS et al., 2007). Este tipo de lesão pré-neoplásica consiste em criptas que evoluem cronologicamente com fenômenos proliferativos, hiperplásicos, displásicos e pequenos adenomas que podem evoluir para adenocarcinomas (MONTENEGRO et al., 2003; MURILO et al., 2004). Também foi observado que os FCA aberrantes apresentam mudanças no padrão de atividade enzimática, como redução da atividade da hexosaminidase (BARROW et al., 1990; PRETLOW et al., 1990, PRETLOW et al.,1993) e da produção de mucinas, com aumento de sialomucinas e perda de sulfomucinas, fenômeno geralmente associado ao grau de displasia e multiplicidade das criptas (UCHIDA et al., 1997; SANDFORTH et al., 1988; FEMIA et al., 2004).

Alterações genéticas nos FCA, tais como mutações nos genes *K-ras*, APC e TP53, relacionadas à proliferação celular e presença de instabilidade de microssatélites, são um sensor de dano ao sistema de reparo do DNA e alterações nesses genes podem se associar à inflamação e, portanto, à expressão dos genes INOS e COX-2, por exemplo (SMITH et al., 1994; HEINEN et al., 1996; NUCCI et al., 1997; TAKAHASHI; WAKABAYASHI, 2004). Destaca-se ainda que os FCA com maior grau de displasia podem apresentar acúmulo citoplasmático e nuclear de β-catenina, que é um marcador potencial de progressão neoplásica (YAMADA et al., 2000; YAMADA; MORI, 2003; HATA et al., 2004).

Tem sido proposto que o número total, a distribuição e a multiplicidade dos FCA correlacionam-se com a incidência de tumores do cólon (BIRD, 1987; MC LELLAN; BIRD, 1988[b]; TUDEK et al., 1989; MAGNUSON et al., 1993). Relata-se também que há evidências de que os FCA são uma importante ferramenta nos estudos de agentes quimioprotetores ou quimiopreventivos do desenvolvimento neoplásico, induzido por cancerígenos químicos (STEVENS et al., 2007). Assim, a

multiplicidade de criptas é um parâmetro o importante para avaliar a progressão dos FCA em estudos de carcinogênese experimental, bem como entender a patogênese do câncer do cólon (CHENG; LAI, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* sobre a carcinogênese coloretal induzida por 1,2 dimetilhidrazina.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum*, frente aos danos causados pela 1,2-dimetilhidrazina, em sangue periférico de camundongos *Swiss*, por meio do ensaio do cometa.

Avaliar os efeitos mutagênicos e antimutagênicos do extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum*, frente aos danos causados pela 1,2-dimetilhidrazina, em sangue periférico de camundongos *Swiss*, por meio do teste do micronúcleo.

Avaliar os efeitos imunoestimulatórios do extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum*, frente aos danos causados pela 1,2-dimetilhidrazina, por meio do ensaio de fagocitose esplênica.

Avaliar os efeitos carcinogênicos e anticarcinogênicos do extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum*, frente a danos causados pela 1,2-dimetilhidrazina, em camundongos *Swiss*, por meio do teste de focos de criptas aberrantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Agentes Químicos

4.1.1 1,2-Dimetilhidrazina (DMH)

A 1,2 Dimetilhidrazina (DMH) (CAS No. 306-37-6; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na dose de 35mg/kg peso corpóreo (p.c.), foi diluída, no momento do uso, em solução de EDTA (0,37mg/ml) e administrada nos animais o volume de 0,1ml/10g (p.c.) via intraperitoneal (i.p.). Foram realizadas quatro aplicações de DMH, sendo duas doses por semana, durante duas semanas, para a indução dos FCA (BOLOGNANI et al., 2001).

4.1.2 Coleta e identificação do material botânico

As cascas de exemplares de *M. polymorphum* (Less) Cabr. ssp. *floccosa* Cabr. de ocorrência natural em Curitiba - PR, foram coletadas em Maio/2011. A planta foi identificada pelo Prof. Dr. Armando Carlos Cervi, do Departamento de Botânica da UFPR. Uma exsicata foi depositada no herbário da mesma instituição sob o número #30100.

4.1.3 Preparação do extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* (EEMP)

As cascas foram secadas em estufa a 40ºC, moídas e extraídas 3 vezes com etanol 95% (500 mL para cada 100 g de material) a temperatura ambiente, com renovação do solvente a cada 24 h. As soluções obtidas foram reunidas e o solvente evaporado a pressão reduzida em rotaevaporador, fornecendo o extrato bruto, com rendimento de 3% em relação a massa inicial seca.

Foi utilizado o extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* (EEMP) dissolvido em solução hidroalcólica 1,2% de etanol 95º GL, na concentração de 100mg/Kg p.c., e a administração foi feita por gavage (v.o) no volume de 0,1ml/10g (p.c.). Essa dose foi escolhida, por possuir uma efetiva atividade anti-inflamatória e

doses maiores não possui benefícios indicados para uso (PIONERDO et al., 2011; DAVID et al., 2014).

4.2 Animais

Foram utilizados 42 camundongos machos *Swiss (Mus musculus)* em idade reprodutiva, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CCBS/UFMS). O experimento foi conduzido no biotério do Laboratório Biocapri (CCBS/UFMS). Os animais foram mantidos em caixas de propileno recobertas por cepilho e alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*. A temperatura e luminosidade foram controladas utilizando-se fotoperíodo de doze horas (12 horas de luminosidade: 12 horas de escuro), com temperatura de 22±2ºC e umidade de 55%±10 em estante ventilada (ALESCO® e520). O experimento foi conduzido segundo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), observando as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (Protocolo #401/2012).

4.3 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais (n=7/grupo): controle negativo, DMH, EEMP, pré-tratamento, simultâneo e pós-tratamento.

O período de experimentação foi de 12 semanas, segundo Rowland (1998), com modificações.

Os animais do grupo controle negativo receberam solução hidroalcoólica, por via oral, (v.o.) todos os dias do experimento, até a 12ª semana, sendo que na 3ª e 4ª semanas foram administradas duas doses de solução de EDTA intraperitoneal (i.p.).

Os animais do grupo controle positivo receberam solução hidroalcoólica (v.o.) até a 12ª semana, sendo que na 3ª e 4ª semanas foram administradas duas doses de solução de DMH (i.p.), concomitantes com a administração de solução hidroalcoólica (v.o.).

Os animais do grupo EEMP, receberam EEMP (v.o.), todos os dias, até a 12ª semana, e, duas doses de EDTA (i.p.) foram administradas na 3ª e 4ª semanas, concomitantes com a administração do EEMP (v.o.).

No grupo pré-tratamento, foi administrado EEMP (v.o.) aos animais durante as duas primeiras semanas (1ª e 2ª), nas duas semanas subsequentes (3ª e 4ª) foi administrado DMH (i.p.), concomitante com a administração de solução hidroalcoólica (v.o.), nas semanas posteriores, foram administrados apenas a solução hidroalcoólica (v.o.) até o último dia de experimentação.

No grupo simultâneo, foi administrado aos animais a solução hidroalcoólica (v.o.), durante as duas primeiras semanas (1ª e 2ª); nas duas semanas subsequentes (3ª e 4ª) foi administrado o EEMP (v.o.), diariamente, e DMH (i.p.) duas vezes por semana; da 5ª à 12ª semana os animais voltaram a receber a solução hidroalcoólica (v.o.).

No grupo pós-tratamento foi administrado solução hidroalcoólica (v.o.) nas 4 primeiras semanas, sendo que na 3ª e 4ª semanas administrou-se a DMH (i.p.), duas vezes por semana; nas oito semanas seguintes (5ª à 12ª), foi administrado somente o EEMP (v.o.).

As coletas de amostras de sangue periférico (por punção caudal), realizadas para avaliar a integridade genética, foram feitas em 24 e 48 horas após a última administração do EDTA ou DMH, para as avaliações do cometa e micronúcleo, respectivamente. A coleta do baço e dos intestinos para a avaliação da fagocitose esplênica e dos FCA, respectivamente, foram realizadas ao final das 12 semanas de experimentação.

Para análise dos parâmetros biométricos, a massa corporal foi aferida no início experimento. No dia da eutanásia, foi aferida a massa corporal, bem como os órgãos (coração, pulmão, rins, fígado e baço).

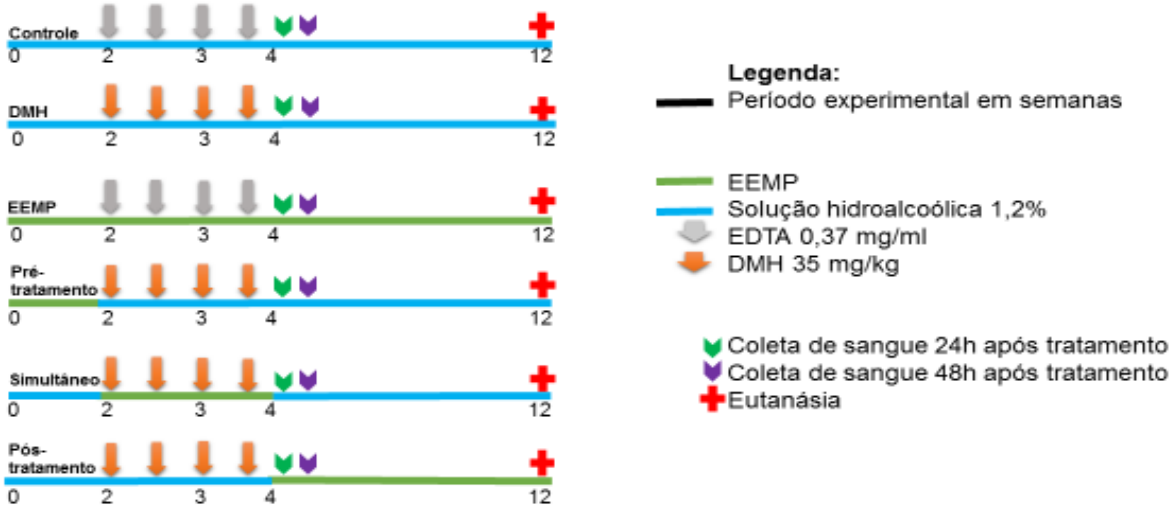

Figura 3 – Delineamento experimental – Fonte: Limeiras, 2016.

4.4 Ensaios Biológicos

4.4.1 Ensaio do Cometa

Para realização do ensaio do cometa, foi utilizado o protocolo de Singh e cols. (1988), onde foi homogeneizado 20µL de sangue periférico e 120µL de agarose de LPM (0,5%). Em seguida essa solução foi depositada em lâminas pré-cobertas com agarose normal (5%) e recobertas com lamínula de vidro. Posteriormente as lâminas foram resfriadas a 4ºC por 20 minutos. Fez-se então a remoção das lamínulas, e a imersão das mesmas em solução de lise recentemente preparada (89,0ml de estoque de lise – 2,5M NaCl, 100,0mM EDTA, 10,0mM Tris, pH 10,0 corrigido com NaOH sólido; 1,0mL de Triton X-100 e 10,0mL de DMSO). A lise ocorreu por 1 hora, à temperatura de 4ºC, protegida da luz. Em seguida as lâminas foram levadas à cuba de eletroforese com tampão de pH >13,0 (300,0mM NaOH e 1,0mM EDTA, preparado a partir de uma solução estoque de NaOH 10,0N e EDTA 200,0mM pH10,0) por um período de 20 minutos à 4ºC para desnaturação do DNA. Em seguida, foi realizada a eletroforese à 25,0V e 300,0mA (1,25V/cm) por 20 minutos. As lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (0,4M Tris-HCl), durante 3 ciclos de cinco minutos cada, secas ao ar livre e fixadas em álcool etílico absoluto por 10 minutos. O material foi corado a *posteriori* (100,0µL de brometo de etídio - $20x10^{-3}$mg/mL) e analisado em microscópio de epifluorescência (Bioval®) em aumento de

40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Como descrito por Kobayashi e cols. (1995), analisou-se 100 células por animal classificando-se os cometas em: (classe 0) células não danificadas que não apresentam cauda; (classe 1) células com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; (classe 2) células com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide; (classe 3) células com cauda maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide. Células apoptóticas, que apresentavam nucleóide totalmente fragmentado, não foram contabilizadas. O escore total foi calculado pela somatória dos valores resultantes da multiplicação do total de células observadas em cada classe de lesão as quais pertenciam pelo valor da classe.

4.4.2 Ensaio do Micronúcleo

Foi utilizado o protocolo de Hayashi et al. (1990) com modificações de Oliveira et al. (2009), no qual foi utilizado 40µL de sangue periférico, coletados 48 horas depois da administração da última dose de EDTA/DMH. O sangue foi depositado em um lâmina pré-coberta por 20,0µL de Alaranjado de Acridina (1,0mg/mL), logo após foram recobertas por uma lamínula. Este material permaneceu em freezer (-20º C) por um período mínimo de cinco dias. O material foi avaliado em microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A) no aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Um total de 2.000 células/animal foram analisadas e a análise estatística foi realizada por meio do teste Anova/Tukey ($p<0,05$).

4.4.3 Fagocitose esplênica

Na 12ª semana, após a eutanásia, foram coletados os baços dos animais, e 1/3 desse órgão foi macerado em solução fisiológica para a obtenção de uma suspensão homogênea de células por sucessivas aspirações com pipeta de Pasteur. Em seguida, 100 microlitros dessa suspensão celular foram colocadas em uma lâmina previamente corada com alaranjado de acridina (1mg/mL) recoberta por uma lamínula. As lâminas foram estocadas em um freezer até o momento da análise, que foi realizada em microscópio de fluorescência (Bioval®, Model 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 e colaboradores (1990).

4.4.4 Teste de Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

Após a eutanásia procedeu-se a retirada da porção final do intestino, Esses abertos pela linha mesentérica e fixados em isopores e posteriormente mergulhados em solução tamponada de formalina 10% por um período mínimo de 24 horas. No momento da análise, cada segmento do cólon foi corado com solução de azul de metileno 10% por 10 minutos e depositado em uma lâmina com a mucosa voltada para cima. A análise foi realizada em microscópio óptico em aumento de 10 vezes. Toda a mucosa foi avaliada para a identificação e quantificação dos FCA. A identificação dos FCA foi baseada nos critérios utilizados por Bird (1987): (I) foco constituído de uma única cripta - a cripta aberrante apresenta revestimento por camada epitelial espessa, com abertura lumial elíptica e de tamanho superior (ao menos 2 vezes) aos das criptas normais circunvizinhas; (II) foco com duas ou mais criptas - as criptas aberrantes formam blocos distintos e ocupam uma área maior que a ocupada por um número equivalente de criptas de morfologia normal. Não há presença de criptas normais separando as criptas aberrantes dentro desses focos. Para análise estatística dos dados provenientes do teste de FCA, o número total de FCA, de criptas aberrantes por focos e a relação cripta/foco, nos diferentes grupos foram comparados utilizando-se ANOVA/Tukey ($p<0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros Biométricos

O peso inicial, final e ganho de peso dos animais não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Tabela 1). O mesmo ocorreu para o peso absoluto do coração, pulmão, rins e baço (Tabela 2) e também para o peso relativo do coração, pulmão, fígado e baço (Tabela 3). Quando avaliado o peso absoluto do fígado (Tabela 2) observou-se redução ($p<0,05$) dos grupos EEMP, tratamento simultâneo e pós-tratamento em relação ao controle. Foi verificado, também, aumento ($p<0,05$) do peso relativo dos rins do grupo pós-tratamento em relação aos demais (Tabela 3).

Somente o peso absoluto do fígado apresentou variação significativa. No entanto, quando o peso relativo foi avaliado, essa diferença não permaneceu, o que sugere ausência de toxicidade. Apesar disso, o peso relativo dos rins dos animais do protocolo de pós-tratamento aumentou de forma estatisticamente significativa, e esse fato precisa ser avaliado em experimentos futuros sobre função renal.

Tabela 1 – Efeito do EEMP sobre a variação de peso corpóreo dos animais:

Grupos Experimentais	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)
Controle	41,42± 0,92	41,14± 0,59	-0,28±1,04
DMH	38,28± 0,60	40,57± 0,29	2,28±0,42
EEMP	39,42± 0,86	40,42± 0,36	1,00± 1,11
Pré-tratamento	38,71± 0,56	40,57± 0,20	1,85±0,45
Simultâneo	38,28± 1,16	38,28± 1,44	0,00±1,23
Pós-tratamento	39,85± 0,59	38,85± 0,79	-1,00±0,57

Legenda: Controle – EDTA 0,1mL/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH –1,2–Dimetilhidrazina, 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas (controle positivo); Extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* – EEMP 100mg/kg p.c. durante 12 semanas; Pré-tratamento – EEMP 100mg/kg p.c. durante as 2 primeiras semanas + DMH 35mg/Kg p.c. durante 2 semanas; Tratamento Simultâneo – EEMP 100mg/kg p.c. + DMH 35mg/Kg, p.c.durante 2 semanas; Pós-Tratamento – DMH 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + EEMP 100mg/kg p.c. durante 10 semanas posteriores ($p>0,05$; ANOVA/Tukey).

Tabela 2 – Efeito do EEMP sobre a variação do peso absoluto dos animais:

Grupos Experimentais	Peso Total (g)				
	Coração	**Pulmão**	**Rins**	**Fígado**	**Baço**
Controle	0,2200±0,0104[a]	0,2588±0,0082[a]	0,5500±0,0111[a,b]	2,2885±0,0613[b,c]	0,1428±0,0086[a]
DMH	0,1842±0,0071[a]	0,2341±0,0137[a]	0,6257±0,0130[b]	2,2885±0,0623[b,c]	0,1714±0,0040[a]
EEMP	0,2300±0,0111[a]	0,2823±0,0130[a]	0,5500±0,0302[a,b]	1,9342±0,0632[a]	0,1500±0,0059[a]
Pré-tratamento	0,2485±0,0131[a]	0,2851±0,0174[a]	0,5971±0,0180[a,b]	2,0742±0,0599[a,b]	0,1485±0,0059[a]
Simultâneo	0,1914±0,0112[a]	0,2776±0,0101[a]	0,5214±0,0193[a]	1,9528±0,0546[a]	0,1542±0,0123[a]
Pós-tratamento	0,1957±0,0151[a]	0,2895±0,0139[a]	0,6342±0,0285[b,c]	1,9228±0,0675[a]	0,1614±0,0055[a]

Legenda: Controle – EDTA 0,1mL/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH –1,2–Dimetilhidrazina, 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas (controle positivo); Extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* – EEMP 100mg/kg p.c. durante 12 semanas; Pré-tratamento – MP 100mg/kg p.c. durante as 2 primeiras semanas + DMH 35mg/Kg p.c. durante 2 semanas; Tratamento Simultâneo – EEMP 100mg/kg + DMH 35mg/Kg, p.c.durante 2 semanas; Pós-Tratamento – DMH 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + EEMP 100mg/kg p.c. durante 10 semanas posteriores. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$; ANOVA/Tukey).

Tabela 3 – Efeito do EEMP sobre a variação do peso relativo dos animais:

Grupos Experimentais	Peso relativo (g)				
	Coração	**Pulmão**	**Rins**	**Fígado**	**Baço**
Controle	0,0053±0,0002[a,b]	0,0062±0,0002[a,b]	0,0133±0,0003[a]	0,0557±0,0020[a,b]	0,0034±0,0002[a]
DMH	0,0045±0,0002[a]	0,0057±0,0003[a]	0,0154±0,0003[a,b]	0,0564±0,0018[b]	0,0042±0,0000[a]
EEMP	0,0056±0,0002[a,b]	0,0070±0,0003[a,b]	0,0136±0,0008[a]	0,0478±0,0016[a]	0,0037±0,0002[a]
Pré-tratamento	0,0061±0,0003[b]	0,0070±0,0004[a,b]	0,0147±0,0004[a,b]	0,0511±0,0015[a,b]	0,0036±0,0001[a]
Simultâneo	0,0050±0,0003[a,b]	0,0072±0,0003[b]	0,0136±0,0005[a]	0,0512±0,0015[a,b]	0,0040±0,0003[a]
Pós-ratamento	0,0050±0,0003[a,b]	0,0074±0,0004[b]	0,0163±0,0008[b]	0,0497±0,0025[a,b]	0,0041±0,0001[a]

Legenda: Controle – EDTA 0,1mL/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH –1,2–Dimetilhidrazina, 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas (controle positivo); Extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* – EEMP 100mg/kg p.c. durante 12 semanas; Pré-tratamento – MP 100mg/kg p.c. durante as 2 primeiras semanas + DMH 35mg/Kg p.c. durante 2 semanas; Tratamento Simultâneo – EEMP 100mg/kg + DMH 35mg/Kg, p.c.durante 2 semanas; Pós-Tratamento – DMH 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + EEMP 100mg/kg p.c. durante 10 semanas posteriores. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$; ANOVA/Tukey).

5.2 Integridade genética e prevenção de danos no DNA

Os ensaios do cometa e do micronúcleo demonstraram que o EEMP não tem ação genotóxica e nem mutagênica visto que a frequência de células lesionadas e/ou micronucleadas, respectivamente, não diferiu do controle (Tabela 4 e 5).

A ação antigenotóxica foi observada nos protocolos de pré-tratamento e tratamento simultâneo, e as %RD foram de 81,88 e 93,12, respectivamente (Tabela 4). Já a atividade antimutagênica foi observada em todos os protocolos e as %RD foram de 77,09, 94,41 e 78,21 para os protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 4. Efeito do EEMP sobre a média da freqüência de células lesionadas, distribuição entre as classes de danos e score referentes aos testes de genotoxicidade e antigenotoxicidade do extrato etanólico de Moquiniastrum polymorphum no ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos machos.

Grupos experimentais	Células lesionadas	Classe de danos				Score	Redução de danos (%)
		0	1	2	3		
Genotoxicidade							
Controle	0,58±0,29[a]	99,42±0,29[a]	0,28±0,18[a]	0,28±0,18[a]	0,00±0,00[a]	0,85±0,45[a]	
DMH	23,43±1,28[b]	75,57±1,28[b]	14,00±1,39[b]	9,85±0,40[b]	0,57±0,36[a]	32,42±1,66[b]	
EEMP	1,58±0,57[a]	98,42±0,57[a]	1,14±0,40[a]	0,28±0,28[a]	0,14±0,14[a]	2,14±1,05[a]	
Antigenotoxicidade							
Pré-tratamento	4,72±0,83[a]	95,28±0,83[a]	4,28±0,60[a]	0,42±0,29[a]	0,00±0,00[a]	5,14±1,10[a]	81,88
Simultâneo	2,15±0,59[a]	97,85±0,59[a]	1,71±0,36[a]	0,42±0,29[a]	0,00±0,00[a]	2,57±0,86[a]	93,12
Pós-tratamento	24,29±3,24[b]	75,71±3,24[b]	16,14±1,69[b]	7,28±1,84[b]	0,85±0,34[b]	33,28±5,55[b]	-3,73

Legenda: Controle – EDTA 0,1mL/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH –1,2–Dimetilhidrazina, 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas (controle positivo); Extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* – EEMP 100mg/kg p.c. durante 12 semanas; Pré-tratamento – MP 100mg/kg p.c. durante as 2 primeiras semanas + DMH 35mg/Kg p.c. durante 2 semanas; Tratamento Simultâneo – EEMP 100mg/kg + DMH 35mg/Kg, p.c.durante 2 semanas; Pós-Tratamento – DMH 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + EEMP 100mg/kg p.c. durante 10 semanas posteriores. Classe de danos: Classe 0 - células não danificadas e que não apresentaram cauda; Classe 1 - células com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; Classe 2 - células com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide; Classe 3 - células com cauda maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide. O score total foi calculado pela somatória dos valores resultantes da multiplicação do total de células observadas em cada classe de lesão as quais pertenciam pelo valor da classe. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$; ANOVA/Tukey).

Tabela 5 – Efeito do EEMP sobre a freqüência total, valores médios ± erro padrão da média e porcentagem de redução de danos referentes aos testes de mutagenicidade e antimutagenicidade no ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos tratados com extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum*

Grupos Experimentais	Frequências de micronúcleo	Média ± EPM	%RD
	48hrs	48hrs	48hrs
Mutagenicidade			
Controle	107	15,28±1,04[a]	-
DMH	286	40,85±1,90[c]	-
EEMP	142	20,28±1,14[a,b]	-
Antimutagenicidade			
Pré - Tratamento	148	21,14±1,17[b]	77,09
Simultâneo	117	16,71±0,64[a,b]	94,41
Pós - Tratamento	146	20,85±1,24[b]	78,21

Legenda: Controle – EDTA 0,1mL/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH –1,2–Dimetilhidrazina, 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas (controle positivo); Extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* – EEMP 100mg/kg p.c. durante 12 semanas; Pré-tratamento – MP 100mg/kg p.c. durante as 2 primeiras semanas + DMH 35mg/Kg p.c. durante 2 semanas; Tratamento Simultâneo – EEMP 100mg/kg + DMH 35mg/Kg, p.c.durante 2 semanas; Pós-Tratamento – DMH 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + EEMP 100mg/kg p.c. durante 10 semanas posteriores. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$; ANOVA/Tukey).

5.3 Fagocitose esplênica

A administração de DMH, EEMP e pré-tratamento determinaram a redução da fagocitose esplênica em 3,80, 28,37 e 30,45 pontos percentuais. Já nos protocolos de tratamento simultâneo e pós-tratamento, ocorreu um aumento da atividade fagocítica na ordem de 39,10 e 94,82 pontos percentuais (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito do EEMP sobre o número total, frequência média ± erro padrão da média (EPM) e porcentagem de células com ou sem evidência de fagocitose esplênica em camundongos machos.

Grupos experimentais	Evidência de Fagocitose	
	Média ± Erro padrão	**Porcentagem(%)**
Controle	41,28±1,61[b]	20,64
DMH	39,71±2,03[b]	19,85
EEMP	29,57±1,49[a]	14,78
Pré-tratamento	28,71±1,70[a]	14,35
Simultâneo	57,42±1,52[c]	28,71
Pós-tratamento	80,42±2,01[d]	40,21

Legenda: Controle – EDTA 0,1mL/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH –1,2–Dimetilhidrazina, 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas (controle positivo); *Moquiniastrum polymorphum* – MP 100mg/kg p.c. durante 12 semanas; Pré-tratamento – MP 100mg/kg p.c. durante as 2 primeiras semanas + DMH 35mg/Kg p.c. durante 2 semanas; Tratamento Simultâneo – MP 100mg/kg + DMH 35mg/Kg, p.c.durante 2 semanas; Pós-Tratamento – DMH 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + MP 100mg/kg p.c. durante 10 semanas posteriores. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$; ANOVA/Tukey).

5.4 Redução da formação de FCA

O EEMP não causou a formação de FCA e possui capacidade de prevenir a formação desse biomarcador tumoral. A %RD foi de 62,13, 86,40 e 95,14 para os protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7- Efeito do EEMP sobre o número, distribuição e redução de danos de FCA no cólon de camundongos tratados com extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum*.

Grupos Experimentais	Total de FCA		%RD	Total de Criptas Aberrantes (CA)	VA de CA/Foco				Relação de CA/Focos
	VA	VM ± EPM			1CA/Foco	2CA/Foco	3CA/Foco	4CA/Foco	
Carcinogenicidade									
Controle	1	0,14±0,14[a]	-	1	1	0,00	0,00	0,00	1,00
DMH	104	14,85±1,26[c]	-	165	58	35	7	4	1,58
EEMP	1	0,14±0,14[a]	-	1	1	0,00	0,00	0,00	1,00
Anticarcinogenicidade									
Pré-tratamento	40	5,71±1,46[b]	62,13	55	12	10	5	2	1,37
Simultâneo	15	2,14±0,55[a,b]	86,40	20	13	3	1	0,00	1,33
Pós-tratamento	6	0,85±0,46[a]	95,14	8	6	1	0,00	0,00	1,33

Legenda: Controle – EDTA 0,1mL/10g, p.c. (peso corpóreo); DMH –1,2–Dimetilhidrazina, 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas (controle positivo); Extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* – EEMP 100mg/kg p.c. durante 12 semanas; Pré-tratamento – MP 100mg/kg p.c. durante as 2 primeiras semanas + DMH 35mg/Kg p.c. durante 2 semanas; Tratamento Simultâneo – EEMP 100mg/kg + DMH 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas; Pós-Tratamento – DMH 35mg/Kg, p.c. durante 2 semanas + EEMP 100mg/kg p.c. durante 10 semanas posteriores. VM: Valor médio; EPM: erro padrão da média; CA: criptas aberrantes; VA: valor absoluto; Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$; ANOVA/Tukey).

6 DISCUSSÃO

A *M. polymorphum* é uma planta usada, com frequência, na medicina popular para o tratamento de inflamações (GARLET; IRGANG, 2000; BUENO et al., 2005; ARAMBARRI et al., 2008; PIORNEDO et al., 2011). Em relação aos seus efeitos sobre o DNA, dois estudos foram encontrados, sendo um deles realizado em salmonela (HORN; VARGAS, 2008) e outro, em camundongos fêmeas prenhes (DAVID et al., 2014). Esse último indica que o EEMP não é mutagênico e nem teratogênico, o que sugere segurança do uso dessa planta medicinal inclusive durante a gestação. Nosso trabalho corrobora essa afirmativa de segurança e, pioneiramente, demonstra que o EEMP não é genotóxico e nem mutagênico em camundongos machos mesmo quando administrado durante oito semanas consecutivas, tempo esse mais longo que os outros tratamentos que estão descritos para essa planta.

O presente estudo também é o primeiro a descrever os efeitos quimiopreventivos dessa planta e a sua capacidade de prevenir a carcinogênese química em intestino de camundongos machos *Swiss.*

De acordo com Steward (2013), quimioprevenção é a capacidade que produtos naturais ou sintéticos possuem de prevenir o câncer e/ou suprimir ou reverter a carcinogênese em suas fases iniciais. Por esse motivo, ensaios de curta duração, como os ensaios de cometa e micronúcleo, são empregados com sucesso no screening para substâncias anticancerígenas (KAMMANN et al., 2001). Por meio desses testes, a presente pesquisa demonstrou a eficiência do EEMP na prevenção de danos genotóxicos e mutagênicos e, assim, confirmou o efeito quimiopreventivo do extrato com %RD que atingiu 94,41. Este resultado indicou a necessidade de um teste sequencial, com estudos de média ou de longa duração onde foram avaliados os biomarcadores tumorais ou mesmo a neoplasia instalada (BIRD, 1987; SCHMELZ et al., 2000; MAURIN, 2007). Diante disso, optamos pelo teste de FCA, um teste de média duração (BIRD, 1995; HAMBLY et al., 1997; KIM et al., 1998; SCHMELZ et al., 2000, BAZO et al., 2002; AGNER et al., 2005). Para que houvesse a indução dos FCA, foi utilizado a DMH, pois sabidamente ela desencadeia uma reação inflamatória leve e um aumento da proliferação celular na mucosa do cólon (KRUTOVSKIKH; TUROSOV, 1994; COUSSENS; WERB, 2002). Sua aplicação sucessiva resulta na proliferação contínua, havendo um aumento do número de

células em fase de síntese de DNA (DESCHNER, 1978; WARGOVICH *et al*., 1983) e, dessa forma há uma hiperplasia progressiva das criptas e hipertrofia da mucosa (WIEBECKE *et al.,* 1973; RICHADS, 1977).

Esse fato explica a ocorrência de danos genotóxicos (média de 23,43±1,28 células lesionadas), mutagênicos (média de 40,85±1,90 células micronucleadas) e dos marcadores da carcinogênese intestinal (média de 14,85±1,26 FCA). A administração do EEMP, que é comprovadamente anti-inflamatório (PIONERDO *et al*., 2011), foi capaz de reduzir todos esses biomarcadores tanto no que se refere aos ensaios de curta duração (cometa e micronúcleo) quanto ao ensaio de média duração (FCA). Nesse último ensaio a %RD chegou a 95,15%, o que sugere a atividade anticarcinogênica da *M. polymorphum* também em modelos de carcinogênese química em intestino.

Os compostos quimiopreventivos, também chamados de antimutagênicos (LUIZ, 2002), em geral agem por desmutagênese e bioantimutagênese (GRUTTER et al., 1990; WATERS et al.,1990), sendo capazes de atuar diretamente no composto indutor de danos, principalmente quelando-o ou inativando-o enzimaticamente, ou atuando nas enzimas de reparo, favorecendo a correção dos danos causados pelo agente carcinogênico no DNA, respectivamente (KADA; INOUE; NAMIKI, 1982; KADA; SHIMOI, 1987). Com base nos dados do micronúcleo, apresentados nessa pesquisa, supõe-se que o EEMP pode agir tanto por desmutagênese quanto por bioantimugênese visto que as %RD foram altas em todos os protocolos e os protocolos de pré-tratamento e pós-tratamento indicam as ações de desmutagênese e bioantimutagênese, preferencialmente, respectivamente (ISHII, 2011; PESARINI, 2013).

A redução de células micronucleadas circulantes pode se dar pela fagocitose esplênica (ZU-WEI et al., 1992; BAZO et al., 2002; ISHII et al., 2011). Por esse motivo, o ensaio de fagocitose esplênica também foi realizado nesta pesquisa e observou-se que a administração do EEPM causa discreto aumento da frequência de fagocitose nos protocolos simultâneo e pós-tratamento e, quando administrado isoladamente, não aumenta a atividade fagocítica. Esses dados permitem inferir, portanto, que o principal evento relacionado com a redução de danos mutagênicos seja, realmente, a quimioprevenção e não processo fagocítico.

Corroboram essa hipótese de quimioprevenção/antimutagênese, que está diretamente relacionada com a anticarcinogênese, as altas porcentagens de redução

de danos observadas na mucosa daqueles animais tratados com DMH e associação como EEMP, independentemente do protocolo de administração. A melhor prevenção de FCA aconteceu no protocolo de pós-tratamento mesmo não sendo observadas as melhores %RD para os ensaios de cometa e micronúcleo. Esse fato pode ser explicado com a administração continuada do EEPM no protocolo de pós-tratamento, mesmo depois da indução dos FCA pela administração da DMH que causa inflamação na mucosa intestinal. Assim, o extrato, que é anti-inflamatório, possivelmente tenha reduzido a inflamação no intestino, determinando mudanças bioquímicas e morfológicas na arquitetura da mucosa intestinal. Diante do exposto, supõe, pioneiramente, que a melhor ação anticarcinogênica do EEPM se deva a uma ação combinada de quimioprevenção e anti-inflamação.

Frente ao exposto, sugere-se que o EEMP, além de não ser toxicogenético, é um promissor fitoterápico para a prevenção da carcinogênese intestinal e/ou um importante ponto de partida para a bioprospeção de medicamentos antitumorais e/ou quimiopreventivos.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados conclui-se que o EEMP não é genotóxico e, possui atividade antigenotóxica nos protocolos de pré-tratamento e tratamento simultâneo.

Não foi mutagênico e quando associado ao DMH demonstrou capacidade de antimutagênica em todos os protocolos testados.

O EEMP não aumenta a atividade fagocítica no baço.

O EEMP não é carcinogênico e quando associado ao DMH demonstrou capacidade anticarcinogênica.

Com os dados desse estudo, é possível sugerir que o EEMP, além de não ser toxicogenético, é um promissor fitoterápico para a prevenção da carcinogênese intestinal e/ou um importante um ponto de partida para a bioprospeção de medicamentos antitumorais e/ou quimiopreventivos.

REFERÊNCIAS

AGNER, A.R.; BAZO, A. P.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (Bixa orellana L.) in rat colon carcinogenesis. **Mutat Res.**, v. 582, n. 1-2, p. 146-154, abr 2005.

American Cancer Society Colorectal Cancer. Facts & Figures 2016. Disponível em:<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc 047079.pdf >. Acesso em: 23/03/2016.

AMES, B. N.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens. A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proc. Nat. Acad. Sci**., v.70,n. 8, p. 2281-2285, ago 1973.

ARAMBARRI, A. M.; FREIRE, S. E.; COLARES, M. N.; BAYÓN, N. D.; NOVOA, M. C.; MONTI, C.; STENGLEIN, S. A. Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from Misiones forest of the Paranaense Province (Argentina): part 2. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, Córdoba, v. 43, n. 1/2, p. 31-60, 2008.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet.**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, mai 2001.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada.** 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.

BARROW, B. J.; O' RIORDAN, M. A.; STELLATO, T. A.; CALKINS, B. M.; PRETLOW, T. P. Enzime-altered foci in colons of carcinogen-treated rats. **Cancer Res.**, v. 50, n. 6, p. 1911-6, 1990.

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. **Teratog. carcinog. and mutag.**, v. 22, n.3, p. 183-194, abr 2002.

BELPAEME, K.; COOREMAN, M.; KIRSCH-VOLDERS M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutat Res.**, v. 415, n. 3, p. 167-84, 1998.

BERG, M.; SOREIDE, K. Genetic and epigenetic traits as biomarkers in colorectal cancer. **Int. J. Mol. Sci.,** v. 12, n.12, p. 9426-9439, dez 2011.

BIRD, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. **Cancer Letters**, v.37, p.147–151, 1987.

BIRD, R. P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Lett.**, v. 93, n. 1, p. 55-71, 1995.

BOHNSACK, J. F.; BROWN, E. J. The role of the spleen in resistance to infection. **Annu Rev Med**., v. 37, p. 49-59, 1986.

BOLDI, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. Current Opinion in Chemical Biology, v. 8, p. 281–286, 2004.

BOLOGNANI, F.; RUMNEY, C. J.; POOL- ZOBEL, B.L.; ROWLAND, I.R. Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats. **Eur J. Nutr.**, v. 46, n. 6, p. 293- 300, 2001.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26/2014, de 13 de maio de 2014 – Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf> Acesso em 17/07/2016.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata**. J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, n.4, p. 325-334, 2009.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em Eigenmannia virescens (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. Acta Amazonica, v. 36, n. 3, p. 357-364. 2006.

BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O.; COSTA, R. B.; POTT, A.; POTT, V. J.; SCHEIDT, G. N., BATISTA, M. S. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 39-44, Mar. 2005.

CABRERA, L. A.; KLEIN, R. M. Compostas – tribo Mutisieae, in REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**, Ed. Por Raulino Reitz, v.1, p. 124, 1973.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Ciência e Cultura. vol. 55 n. 3, p. 37-38, São Paulo, jul/set, 2003.

CHANG, W. W. The mode of growth and compartmentalization of neoplastic glands during experimental colon carcinogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 124, p. 420-6, 1986.

CHENG, L.; LAI, M. D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 9, p.2642–9, 2003.

CORPET D.E, PIERRE F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer.,* v. 41, n. 13, p.1911-22, sep 2005.

CORRÊA, T. C. S. Ação do gene supressor de tumor e de metástase RECK no processo de invasão tumoral: modelo de interação célula-matriz extracelular em gliomas humanos. Dissertação para obtenção do grau de mestrado – Universidade de São Paulo (USP), 2005.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. Nature., v. 420, n. 6917, p. 860-867, dez 2002.

DASHWOOD, R. H., Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an “A to Z” guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. **Mut. Res.**, n. 511, p.89-112, 2002.

DAVID, N.; MAURO, M. O.; GONÇALVES, C. A.; PESARINI, J. R.; STRAPASSON, R. L. B.; KASSUYA, C. A. L.; STEFANELLO, M. E. A.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; OLIVEIRA, R. J. Gochnatia polymorpha ssp. floccosa: bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. **J. Ethnopharmacol.**, v.154, n.2, p.370-379, jun 2014.

DESCHNER, E. E. Early proliferative defects induced by six weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine in epithelial cells of mouse distal colon. **Z. Krebsforsch.**, v.91, n. 2, p.205-216, jan 1978.

DIEHL, D.; OESTERLE, D.; ELMLINGER, M. W; HEOFLICH, A.; WOLF, E.; LAHM, H. IGF-II transgenic mice display increased aberrant colon crypt multiplicity and tumor volume after 1,2-dimethylhydrazine treatment. **J. Carcinog.,** v.5, n. 24, nov 2006.

DI GREGORIO C, LOSI L, FANTE R, MODICA S, GHIDONI M, PEDRONI M, et al. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. **Histopathology,** n. 30, p. 328-34, 1997.

DINIZ, F. F.; PERONDI, F.; GONÇALVES, J. A. Epidemiologia e fatores de risco. FGCM de Campos, F.S.P. Regadas, M. Pinho, S.L. de (Eds.), Tratado de Coloproctologia, 1ª edição. Atheneu, São Paulo, p. 303–311, 2012.

DI PAOLO, C. Aplicação do ensaio cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, Centropomus parallelus (Poey, 1860), expostos à ß-naftoflavona. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – Instituto ceanográfico. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DRUCKREY, H.; PREUSSMANN R, MATZKIES F, IVANKOVIC S. Selective production of intestinal cancer in rats by 1,2-dimethylhydrazine. **Naturwissenschaften,** n. 54, p. 285-6, 1967.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS HF, DINIZ MFFM, BARBOSA-FILHO JM et al. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Rev. Bras. Farmacog**., v. 15, n. 4, p. 381-391, 2005.

FEMIA, A. P.; DOLARA, P., CADERNI, G. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoximethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**. v. 25, p. 277-281, 2004.

FENECH, M. The in vitro micronucleus tecknique. Mutat Res., v.455, p.81-95, 2000.

FIALA, E. S. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer**, v. 40, n. 5, p. 2436-2445, 1975.

FUNK, V. A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T. F.; ROBINSON, H. Classification of Compositae., p.171-189, 2009.

GALINDO, T. P. S; MOREIRA, L. M. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish Bathygobius soporator (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). **Genet. Mol. Biol.** v. 32, p. 394-398, 2009.

GARLET, T.M.B.; IRGANG, B.E. Medicinal plants used by rural women workers in Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.4, n.1, p.9-18, dec 2000.

GATTÁS, G. J. F.; LONGATTO, F. A.; MAEDA; M.Y.S. Identificação de micronúcleos (MN) em células de colo uterino de pacientes assintomáticas: correlação dos métodos de Papanicolau e Feulgen-fast-green. **Folha Med**., v.104, p.57-9, 1992.

GATTÁS, G. J. F. Alterações Citogenéticas em indivíduos expostos a agentes mutagênicos do tabaco e do álcool. In: Carvalho MB. Tratado de cirurgia de cabeça e pescoço e otorrinolaringologia. São Paulo: Atheneu p.1491-8, 2001.

GRAB, D. J.; ZEDEK, M. S. Organ-specific effects of the carcinogen methylazoximethanol related to metabolism by nicotinamide adenine dinucleotide dependent dehydrogenase. **Cancer Res**., v. 37, n. 11, p. 4182-4189, 1977.

GRUTTER, A.; FRIEDERICH, U.; WURGLER, F.E. Antimutagenic effects of mushrooms. **Mut. Res.,** v.231, n. 2, p.243-249, ago 1990.

HAMBLY, R. J.; RUMNEY, C. J.; CUNNINGHAME, M.; FLETCHER, J. M. F.; RIJKEN, P. J.; ROWLAND, I. R. Influence of diets containing high and low risk factors for colon cancer on early stages of carcinogenesis in human flora-associated (HFA) rats. **Carcinogenesis**, v.18, n.8, p.1535-1539, 1997.

HATA, K.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; HIROSE, Y.; HARA, A.; QIANG, S.H. et al. Tumor formation is correlated with expression of B-catenin-accumulated crypts in azoximethane-induced colon carcinogenesis in mice. **Cancer Sci.,** v. 95, p. 316-20, 2004.

HAWKS, A.; HICKS, R. M.; HOLSMAN, J. W.; MAGEE, P. N. Morphological and Biochemical Effects of 1.2-Dimethylhydrazine and 1-Methylhydrazine in Rats and Mice. **Br. J. Cancer.**, v.30, n.5, p.429-439, nov 1974.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, J. R. M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orangecoated slides. **Mutation Res.**, v. 245, p.245-249, 1990.

HEDDLE J, A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**.,v.18 n.2, p. 187-190, 1973.

HEINEN, C. D.; SHIVAPURKAR, N.; TANG, Z.; GRODEN, J.; ALABASTER, O. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. **Cancer Res.**, v. 56, n. 5339-41, 1996.

HORN, R.C.; VARGAS, V. M. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the salmonella/microsome assay. **Toxicol In Vitro.**, v. 22, n. 4, p.1043-1049, jun 2008.

HOSEA, S.W.; BROWN, E. J.; HAMBURGER, M. I.; FRANK, M. M. Opsonic requirements for intracellular clearance after splenectomy. **N. Engl. J. Med.,** v. 304, p. 245-50, 1981.

HU, T. U.; LI, L. F.; SHEN, J.; ZHANG, L.; CHO, C. H. Chronic inflammation and colorectal cancer: The role of vascular endothelial growth factor. **Curr. Pharm. Des.**,v. 21, n. 21, p. 2960–2967, jun 2015.

HUMPHRIES, A.; WRIGHT, N. A. Colonic crypt organization and tumorigenesis. **Nat Rev Cancer,** n. 8, p.415–424, 2008.

INCA – Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativa 2016. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf> . Acesso em 22/06/2016.

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.**, v. 59, n. 3, p. 412-422, 2011.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 488, 2004.

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, n. 3, p. 113-116, set 1987.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mut. Res**., v. 98, 2001.

KELLOFF, G. J., et al. Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. **J. Nutr.** v.130, p.467s-71s, feb 2000.

KIM, J. M.; ARAKI, S.; KIM, D J.; PARK, C. B; TAKASUKA, N.; BABA-TORIYAMA, H.; OTA, T.; NIR, Z.; KHACHIK, F;SHIMIDZU, N; TANAKA, Y.;OSAWA, T; URAJI, T.; MURAKOSHI, M.; NISHINO, H.; TSUDA, H. Chemoprevention effects of carotenoids

and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2 dimethylhydrazine initiation. **Carcinogenesis**, v. 19, n 1, p. 81- 85, 1998.

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.

KOEHN, F. E., CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Review Drug Discovery**, v. 4, p. 206–220, 2005.

KORNHAUSER, A.; WAMER, W. G.; LAMBERT, L. L. Light- induced dermal toxicity: Effects on the cellular and the molecular level. In: MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. I. (Eds). **Dermal -toxicology.** 4 th edition. New York: Hemisphere, p. 527-569, 1991.

KURODA, Y.; HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mut. Res.**, Amsterdam, v. 436, n. 1, p. 69-97, 1999.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat. Res.**, v. 455, n. 1-2, p. 155-66, 2000.

KRUTOVSKIKH, V. A.; TUROSOV, V. S. Tumor of intestines. In: TUROSOV, V. S.; MORH, U. (Eds). Pathology of tumors in laboratory animals. 2nd ed., Lyon:Yarc, V II, p.195-211, 1994.

LABIANCA, R.; NORDLINGER, B.; BERETTA, G.D.; MOSCONI, S.; MANDALÀ, M.; CERVANTES. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol,** v. 24, n. 6, p. 64-72, 2013.

LAMONT, J. T.; O'GORMAN, T. A. Experimental colon cancer. **Gastroenterol**., v. 75, n. 6, p. 1157-1169, 1978.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat Res.** v. 544, n.1, p. 43-64. 2003.

LEWIN, B. **Genes VII.** Porto Alegre: Artmed, 955p, 2001.

LUIZ, R. C. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do Agaricus blazei Murill (Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, in vitro. 2002. Dissertação [Mestrado] – Instituto Agronômico do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MAYER, D.; TROCHERIS, V.; HACKER, H. J.; VILLARD, V.; MURAT, J. C.; BANNASCH, P. Sequential Histochemical and morphometric studies on preneoplastic and neoplastic lesions induced in rat colon by 1,2 dimethylhydrazine. **Carcinogenesis.**, v.8, p.155-61, 1987.

MAGNUSON, B. A.; CARR, I, BIRD, R. P. Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid**. Cancer Res.,** v. 53, p. 4499-504, 1993.

MCLELLAN, E. A.; BIRD, R. P. Specificity study to evaluate induction of aberrant crypts in murine colon. **Cancer Res.,** v. 48, n. 21, p. 6183-6, 1988[a].

MCLELLAN, E. A.; BIRD, R. P. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesion in the murine colon. **Cancer Res.**, v. 48, n.21, p. 6186-92, 1988[b].

McKELVEY-MARTIN, V. M.; HO, E. T. S.; MCKEOWN, S. R.; JOHNSTON, S.R.; MCCARTHY, P. J.; RAJAB, N.F.; DOWNES, C. S. Emerging applications of the single gel electrophoresis (comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization comets the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. **Mutagenesis,** v.13, n.1, p.1-8, 1998.

MARTIN, M. S.; MARTIN, F.; MICHIELS, R.; BASTIEN, H.; JUSTRABO, E.; BORDES, M et al. An experimental model for cancer of the colon and rectum. Intestinal carcinoma induced in the rat 1,2- dimethylhydrazine. **Digestion**. 1973; 8: 22-34, 1973.

MARTINS, G. G. et. al. Sesquiterpene lactones of *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* have antineoplastic effects in walker-256 tumor-bearing rats. **Chemico-biological interactions,** v. 228, n. 25, p. 46–56, fev 2015.

MAURIN, N.; FORGUE-LAFITTE, M. E.; LEVY, P.; ZIMBER, A.; BARA, J. Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenis. **Int J Cancer.,** v. 120, n. 3, p. 477-483, 2007.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Toxicologia de Alimentos. São Paulo: Varela. 295 p. 2000.

MONTENEGRO, M. A.; NEGRETTE, M. S.; LERTORA, W. J.; CATUOGNO, M. S. Focus de criptas displásicas inducidas com 1,2 dimetilhidrazina em intestino gruesso de ratas tratadas com molibdeno y tungsteno. **Rev Vet.**, v. 14, p.1, 2003.

MURILO, G.; CHOI, J. K.; PAN, O.; CONTANTINOU, A. L.; MEHTA, R. G. Efficancy of garbanzo and soybean flour in suppression of aberrant crypt foci in the colons of CF-mice. **Anticancer Res.**, v. 24, n. 5, p. 3049-55, 2004.

NAGASAWA, H. T.; SHIROTA, F. N.; MATSUMOTO, H. Decomposition of methylazoxymethanol the aglycone of cycasin in D2O. **Nature**, v. 236, n. 5344, p. 234-235, 1978.

NAMASIVAYAM, N. Chemoprevention in experimental animals. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1215 p. 60–71, 2011.

NUCCI, M. R. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci human colorectal mucosa. **Hum Pathol.**, v. 28, n.12, p.1396-407, 1997.

OCHIAI, M.; USHINGOME M, FUJIWARA K, UBAGAI T, KAWAMORI T, SUGIMURA T, et al. Characterização of dysplatic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1- methyl-6-phenyllimidazo [4,5-b] pyridine. **Am J Pathol.,** v. 163, p. 1607-14, 2003.

OLIVE, P.L. Cell proliferation as a requirement for the development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiat. Res.,**v. 1, n. 117, 79-92, 1989.

OLIVEIRA, R. J.; SALLES, M. J.; DA SILVA, A. F.; KANNO, T. Y. N.; LOURENÇO, A. C. S.; FREIRIA, G. A.; MATIAZI, H. J.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Effects of the polyssacaride B-glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. Regul. Toxicol. Pharmacol., v. 53, p. 164-173, 2009.

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

PANERO, J. L.; FUNK, V. A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. **Mol. Phylogenet. Evol.,** v. 47, p. 757–782, 2008.

PESARINI, J. R.; ZANINETTI, P. T.; MAURO, M. O.; CARREIRA, C. M.; DICHI, J. B.; RIBEIRO. L. R.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, R. J. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of wheat bran in vivo. **Genet. Mol. Res**., v. 12, n. 2, p. 1646-1659, mai 2013.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn. Rev.**, v. 6, p. 1–5, 2012.

PIORNEDO, R. R.; SOUZA, P.; STEFANELLO, M. E. A.; STRAPASSON, R. L. B.; ZAMPRONIO, A. R.; KASSUYA, C. A. L. Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13- dihydrozaluzanin C from Gochnatia polymorpha ssp. floccosa trunk bark in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 133, n. 3, p.1077-1084, fev 2011.

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

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.

PRETLOW, T. P.; O' RIORDAN, M. A.; KOLMAN, M. F.; JURCISEK, J. A. Colonic aberrant crypts in azoximethane-treated F334 rats have decreased hexosaminidase activity. **Am J Pathol.**, v. 136, p. 13-26, 1990.

PRETLOW, T. P.; BARROW, B. J.; ASHTON, W. S.; O' RIORDAN, M. A.; PRETLOW, T. G.; JURCISEK, J. A. et al. Aberrant crypts: Putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. **Cancer Res.**, v.51, p. 1564-7, 1991.

PRETLOW, T. P.; O'RIORDAN, M. A.; SPANCAKE, K. M.; PRETLOW, T. G. Two types of putative preneoplastic lesions identified by hexomedinidase activity in whole-mounts of colons from F344 rats treated with carcinogen. **Am J Pathol.**, v. 142, p.1695-700, 1993.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. Mutagênese Ambiental. Editora Ulbra, Canoas: 1ª edição, p.173-200, 2003.

RICHARDS, T. C. Early changes in the dynamics of crypt cell populations in mouse colon following administration of 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Res.,** v. 37, n. 6, p. 1680-1685, jun 1977.

RYDBERG, B.; JOHANSON K. J. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cell. In: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF (eds). DNA Repair Mechanisms. **New York: Academic Press**; p.465-468, 1978.

RODRIGUES MA, SILVA LA, SALVADORI DM, DE CAMARGO JL, MONTENEGRO MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short-and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Braz J Med Biol Res.**, v. 35, p. 351-5, 2002.

ROWLAND, I. R.; RUMNEY, C. J.; COUTTS, J. T.; LIEVENSE, L. C. Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis** v. 19 n. 2, p.281–285, 1998.

SABA, T. M. Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system. **Arch Intern Med**., v. 126, p. 1031-52, 1970.

SANCHO, G.; FUNK, V. A.; ROQUE, N. Moquiniastrum (Gochnatieae, Asteraceae): disentangling the paraphyletic Gochnatia. **Phytotaxa**, v. 147, p. 26-34, 2013.

SANDFORTH, F.; HEIMPEL, S.; BALZER, T.; GUTSCHMIDT, S.; RIECKEN, E. O. Caracterization of stereomicroscopically identified preneoplastic lesions during dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. **Eur J Clin Invest.**, v. 18, p.655-662, 1988.

SATO, S. I.; TOMITA, I. Short- Term screnings method for prediction of carcinogenicity of chemical substances: Current status and problems of na in vivo rodent micronucleus assay. **Health Scie.,** v.47, n.1, p.1-8, 2

SCHMELZ E. M.; SULLARDS M. C., DILLEHAY D. L., MERRILL, A. H. J. R. Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1,2- dimethylhydrazine-treated CF1 mice**. J Nutr.**, v. 130, n. 3, p. 522-527, 2000.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v.31, p.9-15, 1975

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. **Adv Biochem Eng Biotechnol.**, v.147, p. 59-110, 2015.

SEQUEIRA, J. L. **Influência do processo de reparação de feridas cutâneas na carcinogênese química experimental do cólon no rato** [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1997.

SILVA, J. **O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. Genética na escola.** Universidade Luterana do Brasil, ISSN 1980-3540, Canoas-RS, p. 30-33, 2007.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHENEIDER, A. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells**. Experimental Cell Research,** San Diego, 1: 184-191, 1998.

SMITH, A. J.; STERN, H. S.; PENNER, M.; HAY, K.; MITRI, A.; BAPAT, B. V. et al. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. **Cancer Res**., v. 54, p. 5527-30, 1994.

STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y.; MACARI, P. A. T. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de Gochnatia polymorpha ssp floccosa.** Revista Brasileira de Farmacog., v.16, n.4, p.525-530, Out./Dez. 2006

STEVENS, R. G, SWEDE, H.; HEINEN, C.; JABLONSKI, M.; GRUPKA, M.; ROSS, B. et al. Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. **Cancer Lett.**, v. 248, p. 262-8, 2007.

STRAPASSON, R. L. B.; CERVI, A. C.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; SALVADOR, M. J.; STEFANELLO, M. E. A. Bioactivity-guided isolation of cytotoxic sesquiterpene lactones of Gochnatia polymorpha ssp. floccosa. Phytother. Res., v. 26, n.7, p.1053-6, jul 2012.

STEWARD, W. P., BROWN, K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. **Br J Cancer,** n. 109, p.1-7, jun 2013.

SUNTER, J. P.; APPLETON, D. R.; WRIGHT, N. A.; WATSON, A. J. Pathological features of the colonic tumours induced in rats by the administration of 1.2-dimethylhydrazine. **Virchows Arch B Cell Pathol**., v. 21: 211-23, 1978.

TAKAHASHI, M.; WAKABAYASHI, K. Gene mutations and altered gene expression in azoximethaneinduced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer Sci.**, v. 95, p. 475-80, 2004.

TICE, R. R. The single cell/gel/ Comet assay: a micro gel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Environmental Molecular Mutagenesis, Philips, D. H. & S. Venitt (Eds), **Bios Scientific Publishers Ltd**, Oxford, U. K., p. 315-339, 1995.

TUDEK, B.; BIRD, R. P.; BRUCE, W. R. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. **Cancer Res**., v. 49, n. 5, p. 1236-40, 1989.

UCHIDA, K.; KADO, S.; ONOUE, M.; TOHYAMA, K. Relationship between the nature of mucus and crypt multiplicity in aberrant crypt foci in the rat colon. **J Cancer Res**., v. 88, p. 807-14, 1997.

VERDI, L. G. et al. The Baccharis genus (Asteraceae): Chemical, economic and biological aspects. Quimica Nova, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VERGHESE, M.; RAO, D. R.; CHAWAN, C. B.; SHACKELFORD, L. Dietary inulin suppresses azoxymethane- induced preneoplastic aberrant crypt foci mature fisher 344 rats. J. Nutr., v. 132, p. 2804-2808, 2002.

VOGEL, E. W. **Assessment of chemically-induced genotoxic events: Prospectives and limitations.** Leiden: Universitaire Pers, 1982.

WARGOVICH, M. J.; GOLDBERG, M. T.; NEWMARK, H. L.; BRUCE, W. R. Nuclear aberrations as a short term for genotoxicity to the colon: evaluation of nineteen agents in mice. **J. Natl. Cancer Inst**., v.71, p.133-137, jul 1983.

WARGOVICH, M. J.; PUREWAL, M. Biomarkers of gastrointestinal neoplasia. In: Rustgi AK (Editor), Gastrointestinal Cancers: Biology, Diagnosis and Therapy. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, USA, 1995.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mut. Res.,** v. 238, n. 1, 57–85, jan 1990.

WEINBERG, R. A. How cancer arises. Scientific American., v. 9, n. 3, p. 62-70, set 1996.

WEISBURGER, J. H. Colon carcinogens: Their metabolism and mode of action. **Cancer,** v.28, n.1, p.60–70, jul 1971.

WEST, N. P.; KOBAYASHI, H.; TAKAHASHI, K.; PERRAKIS, A.; WEBER, K.; HOHENBERGER, W. Understanding optimal colonic cancer surgery: comparison of Japanese D3 resection and European complete mesocolic excision with central vascular ligation. **J Clin Oncol**, n.30, v.15, p. 1763–1769, mai 2012.

WHITELEY, L. O.; HUDSON, L. J. R.; PRETLOW, T. Aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats treated with a genotoxic and non-genotoxic colon carcinogen. **Toxicol Pathol.** v. 24, p. 681-9, 1996.

WIEBECKE, B.; KREY, B.; LÖHRS, U. Morphological ad autoradiographical investigations on experimental carcinogenesis and polyp developmental in the intestinal tract of rats and mice. **Virchows Arch. Pathol. Anat.**, v. 360, n. 3, p. 179-193, jun 1973.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research, 2007.

World Health Organization (WHO). All cancers (excluding non-melanoma skin cancer) estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 18/07/2016.

YAMADA, T. et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 60, p. 4761-6, 2000.

YAMADA, Y.; MORI, H. Pre-cancerous lesions of colorectal cancers in rodents: a new concept. **Carcinogenesis,** v. 24, p.1015-9, 2003.

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.

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 401/2012 do Pesquisador Rodrigo Juliano Oliveira, referente ao projeto de pesquisa "Avaliação dos efeitos do extrato, frações e compostos isolados de *Gochnatia polymorpha* em modelos de teratogênese, carcinogênese e inflamação *in vivo* e *in vitro* ", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 19 de abril de 2012 .

Campo Grande, 19 de abril de 2012

Joice Stein
Coordenadora da CEUA

2ª via emitida em 19/02/2013

Joice Stein
Vice-coordenadora da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
http://www.propp.ufms.br/ceua
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184