

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

AÇÃO MODULADORA DO CITRAL E EUGENOL EM
EVENTOS GENÉTICOS EM MACRÓFAGOS
MURINOS *IN VITRO*

MARÍLIA DE PAULA PORTO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação do Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista – UNESP para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas – Área de
Concentração: Genética.

Botucatu-SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

AÇÃO MODULADORA DO CITRAL E EUGENOL EM
EVENTOS GENÉTICOS EM MACRÓFAGOS
MURINOS *IN VITRO*

Mestranda: Marília de Paula Porto
Orientadora: Dra. Daisy Maria Favero Salvadori
Co-orientadora: Dra. Glenda Nicioli da Silva

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação do Instituto de
Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista – UNESP para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas – Área de
Concentração: Genética.

Botucatu-SP
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Porto, Marília de Paula.

Ação moduladora do citral e eugenol em eventos genéticos em macrófagos murinos *in vitro* / Marília de Paula Porto. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2012

Orientador: Daisy Maria Favero Salvadori

Co-Orientador: Glenda Nicioli da Silva

Capes: 20206003

1. Macrófagos. 2. Mutagênese. 3. Genética.

Palavras-chave: Antigenotoxicidade; Citral, Eugenol, Genotoxicidade; Modulação da expressão gênica.

Dedicatória

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

À Deus e Nossa Senhora Aparecida,

por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos
melhores caminhos, coragem para acreditar, força
para não desistir e proteção para me amparar.

À minha mãe (saudades eternas),

pelo amor que me mostrou a direção correta e me
ensinou a ter fé na vida.

À minha família: Francisco Nogueira Porto, Daniel de Paula
Porto, Marina Abdalla de Sousa Porto, avós, tios e tias,
primos e primas,

pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional.
Que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus
desafios.

Agradecimentos

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

Durante esse dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a **Daisy Maria Favero Salvadori**, por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Mesmo chegando sem me conhecer direito, você abriu as portas, como uma mãe que abre os braços para receber um filho. Nesse mundo, repleto de pessoas ruins, você me faz acreditar que os bons são a maioria. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspirações para me tornar melhor em tudo faço e irei fazer daqui para frente. Tenho orgulho em dizer que um dia fui sua orientada.

À **Glenda Nicioli da Silva**, pelos ensinamentos, orientações, incentivo, amizade e dedicação. Você esteve ao meu lado durante esses dois anos (incluindo finais de semana), e não mediu esforços para me ajudar, sempre com uma solução simples para os meus problemas que pareciam ser gigantes.

À Profa. Dra. **Kênya Silva Cunha**, por me mostrar os encantos da mutagênese e pelos ensinamentos durante os meus primeiros passos na vida acadêmica, um exemplo como pessoa e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. **José Maurício Sforcin**, muito obrigada pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições. Por me receber em seu laboratório de portas abertas e sempre estar à disposição, respondendo

minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo. Realmente, deu certo, e você é parte essencial desse trabalho.

Ao Prof. Dr. **Luís Fernando Barbisan**, pelas contribuições realizadas a esse trabalho durante o exame de qualificação.

À Profa. Dra. **Angela Soares**, e ao Prof. Dr. **Silvio Oliveira**, por gentilmente me cederem espaço em seus laboratórios

Aos **animais**, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

Ao Carlos Roberto Gonçalves de Lima, **Carlinhos**, técnico do biotério da experimental, pela colaboração e ajuda com os animais.

À **seção de pós-graduação** do Instituto de Biociências de Botucatu-Unesp e à Profa. Dra. **Claudia Rainho**, pela atenção, apoio e profissionalismo.

Ao **CNPq** e **FUNDUNESP**, pelo auxílio e apoio concedido, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À **FAPESP** pelo incentivo, suporte financeiro e por acreditar no potencial desse estudo.

Aos amigos

“Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só”

Amir Klink

Aos amigos do laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica:

Amanda de Camargo, André Sávio, Camila Gobete, a ajuda de vocês foi essencial para esse trabalho.

Bruno Cesar Ottoboni Luperini, um irmão que encontrei perdido nessa cidade de Botucatu. Obrigada pelos incentivos na parte experimental seja durante o dia ou noite, com chuva, neblina ou sol. Por acreditar que tudo daria certo no final, mesmo quando a esperança era quase nula. Pelo ouvido que escutou tantas reclamações e pelas risadas que amenizavam o *stress* diário.

Danielle Almeida, Elaine Camargo e Juliana Padovani. Amigas e companheiras sempre dispostas a ajudar, vocês foram fundamentais nesses dois anos de trabalho, desde os pequenos até os grandes problemas.

João Paulo de Castro Marcondes e Renato Paschoal Prado, mais que companheiros, amigos para todos os momentos, muito obrigada.

Cristiana Murbachi, Luciana Feliciano, Mariana Bráz e Vanessa Lorenço Peresi. Muito obrigada pelas conversas, risadas, ajudas e companheirismo.

Aos amigos de Botucatu:

Tatiana Bachiega, por sempre estar disposta a ajudar, ensinar e aconselhar, obrigada pela amizade.

Daniela Rodrigues, Guilherme Biondo, Regis Keller, por me receberem em seu laboratório, pelas conversas e ajudas.

Ana Paula Taioqui, Carolina Costa e Ester Caixeta, vocês foram amigas essenciais durante esses dois anos, e com certeza tornaram a vida mais alegre.

Paula Correa Dias, esse pouco tempo de convivência foi o suficiente para reconhecer uma amizade verdadeira, doce e prestativa, obrigada por nunca me negar ajuda.

Aos amigos de longa data:

Amanda Santana, mais que amiga, uma irmã. Muito obrigada por sempre estar junto, me apoiando e ajudando nas minhas decisões.

Laise Andrade, pela amizade que me ajuda a dividir os problemas e a somar alegrias.

Fernanda Cassemiro, Nathália Lima, Natália Virgili, Watson Gama amigos especiais que seguiram seus destinos, mas sempre aparecem quando é preciso.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABELAS.....	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO NO PROCESSO CARCINOGENÉTICO	4
1.2.1 O papel dos macrófagos.....	5
1.2.2 Mediadores moleculares.....	7
Fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B).....	7
Cyclooxygenase-2 (COX-2)	9
Fator alfa de necrose tumoral (TNF- α).....	11
1.3 LESÕES NO DNA E QUIMIOPREVENÇÃO	12
1.4 AGENTES QUIMIOPROTETORES	14
Citral.....	14
Eugenol.....	16
1.5 MÉTODOS PARA AVALIAÇÕES TOXICOGENÉTICAS.....	19
OBJETIVOS.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....	24
3.2 COMPOSTOS-TESTE: CITRAL E EUGENOL	24
3.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	25
3.4 TESTE DO COMETA	26
3.4.1 Análise do potencial genotóxico do citral e do eugenol	26
3.4.2 Análise do potencial antigenotóxico do citral e do eugenol	26
3.5 PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS PARA O TESTE DO COMETA.....	27

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES NF- κ B1 E COX-2 POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR-RT).....	28
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
RESULTADOS	32
4.1 VIABILIDADE CELULAR	33
4.2 GENOTOXICIDADE.....	36
4.3 POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DO CITRAL	37
4.4 POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DO EUGENOL	39
4.5 EXPRESSÃO DOS GENES COX-2, NF- κ B1 E TNF- α APÓS TRATAMENTO COM CITRAL E EUGENOL	41
DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - VIAS DE SINALIZAÇÃO DO NF-KB (ADAPTADA DE SRIVASTAVA & RAMANA, 2009).....	8
FIGURA 2 - MECANISMO DE SÍNTESE DA PROSTAGLANDINA E2 (PGE2) E SUA FUNÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER (ADAPTADA DE DORÉ, 2011).	10
FIGURA 3 - MODELO DE SÍNTESE, SECREÇÃO E ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS ALVOS PELO TNF-A (ADAPTADA DE EGAN, 2004).	11
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CITRAL.....	15
FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DO EUGENOL.	17
FIGURA 6 - NUCLEÓIDES CORADOS COM SYBER GOLD. IMAGENS OBTIDAS COM O SOFTWARE COMET ASSAY IV (PERCEPTIVE INSTRUMENTS), EM AUMENTO DE 400X.....	19
FIGURA 7 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA O ENSAIO DE GENOTOXICIDADE.....	26
FIGURA 8 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ENSAIOS DE ANTIGENOTOXICIDADE.....	27
FIGURA 9 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA A ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	29
FIGURA 10 - VIABILIDADE CELULAR (% DE MACRÓFAGOS VIÁVEIS), COMPOSTOS ISOLADOS.	33
FIGURA 11 - VIABILIDADE CELULAR (% DE MACRÓFAGOS VIÁVEIS), MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO CITRAL EM TRÊS PROTOCOLOS DE TRATAMENTO DISTINTOS.	34
FIGURA 12 - VIABILIDADE CELULAR (% DE MACRÓFAGOS VIÁVEIS). MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO EUGENOL EM TRÊS PROTOCOLOS DE TRATAMENTO DISTINTOS	35
FIGURA 13 - DANOS NO DNA (<i>TAIL INTENSITY</i>) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM O CITRAL.....	36
FIGURA 14 - DANOS NO DNA (<i>TAIL INTENSITY</i>) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM O EUGENOL.....	37
FIGURA 15 - DANOS NO DNA (<i>TAIL INTENSITY</i>) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM O CITRAL E COM A DOXORRUBICINA.	38

FIGURA 16 - DANOS NO DNA (<i>TAIL INTENSITY</i>) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM O EUGENOL E COM A DOXORRUBICINA	40
FIGURA 17 - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO GENE <i>COX-2</i> (A), <i>NF-κB1</i> (B) E <i>TNF-α</i> (C) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CITRAL	42
FIGURA 18 - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO GENE <i>COX-2</i> (A), <i>NF-κB1</i> (B) E <i>TNF-α</i> (C) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EUGENOL	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Danos no DNA (<i>tail intensity</i>) em macrófagos peritoneais de camundongos tratadas <i>in vitro</i> com o citral	75
Tabela 2a. Danos no DNA (<i>tail intensity</i>) em células peritoneais de camundongos tratadas <i>in vitro</i> com o eugenol	76
Tabela 2b. Danos no DNA (<i>tail intensity</i>) em células peritoneais de camundongos tratadas <i>in vitro</i> com o eugenol	77
Tabela 3. Danos no DNA (<i>tail intensity</i>) em células peritoniais de camundongos tratadas <i>in vitro</i> com o citral e com a doxorrubicina (34 µg/mL) em três protocolos distintos	78
Tabela 4. Danos no DNA (<i>tail intensity</i>) em células peritoniais de camundongos tratadas <i>in vitro</i> com o eugenol e com a doxorrubicina (34 µg/mL) em três protocolos distintos	79

RESUMO

Devido a propriedades terapêuticas, várias plantas e seus constituintes químicos vêm sendo muitas vezes utilizados como o primeiro recurso para o tratamento de diversas doenças. Nesse contexto, compostos isolados de plantas têm sido alvos de inúmeros estudos que avaliam, além da atividade, seus possíveis mecanismos de ação. Dentre os compostos com potencial quimioprotetor, o citral e o eugenol merecem atenção devido suas estruturas químicas de monoterpreno e de composto fenólico, respectivamente, e por seus potenciais anti-inflamatório, antiparasitário e antioxidante. Considerando que mutação no DNA pode ser a primeira etapa de várias doenças, e que lesões induzidas nessa molécula podem ser prevenidas ou moduladas por compostos naturais, este estudo objetivou avaliar, pelo teste do cometa, o potencial genotóxico do citral (25, 50 e 100 µg/mL) e do eugenol (0,31, 0,62, 1,24 e 2,48 µg/mL), após diferentes tempos de tratamento (6, 10, 24 e 30 h) e, também, seus possíveis efeitos moduladores sobre danos induzidos no DNA pela doxorubicina (DOX), em diferentes protocolos de tratamento (pré, pós e simultaneamente à DOX) e momentos de análise (12, 24 e 36 h), em macrófagos peritoneais de camundongos. Além disso, foi avaliado o potencial toxicogenômico do citral e do eugenol por meio da modulação da expressão dos genes *NF-κB1*, *COX-2* e *TNF-α* (relacionados a processos inflamatórios) em macrófagos ativados ou não por lipopolissacarídeo de bactéria (LPS). Os resultados mostraram que ambos os compostos apresentaram potencial genotóxico. No caso do citral, a genotoxicidade foi observada para as duas maiores concentrações, mas apenas no tempo de 6h; para o eugenol, o aumento de danos no DNA foi detectado para todas as concentrações, em pelo menos um momento de análise. Com relação ao potencial antigenotóxico, o citral e o eugenol apresentaram efeito protetor em diferentes concentrações e protocolos de tratamento, sendo mais eficazes, respectivamente, no tratamento simultâneo e no pré-tratamento. As análises dos genes *COX-2*, *NF-κB1* e *TNF-α* mostraram que ambos os compostos não alteraram os padrões de expressão em macrófagos inativos. Entretanto, em condição de exposição simultânea ao LPS, o citral nas concentrações de 100 µg/mL e de 50 e 100 µg/mL reduziu a expressão de *COX-2* e *TNF-α*, respectivamente, enquanto o eugenol reduziu a expressão do *TNF-α* somente na maior concentração. Concluindo, o citral e o eugenol apresentaram atividade quimioprotetora contra danos no DNA e atuaram na modulação de genes relacionados a processos inflamatórios. No entanto, a utilização desses compostos em estratégias preventivas e terapêuticas deve ser vista com cautela, uma vez que tanto o citral como o eugenol demonstraram habilidade para induzir alterações na molécula de DNA.

Palavras chaves: citral, eugenol, genotoxicidade, antigenotoxicidade; modulação da expressão gênica

ABSTRACT

Because of the therapeutic properties, several plants and their chemical constituents have been used for treatment of various diseases. Therefore, isolated compounds from plants have been targets of numerous studies that evaluate their activity and mechanisms of action. Among compounds with chemopreventive potential, citral and eugenol have gained attention because of their chemical structures, monoterpene and phenol, respectively, and for their anti-inflammatory, antioxidant and antiparasitic potentials. Since DNA mutation is the first step for some diseases, and since the lesions induced in this molecule can be prevented or modulated by natural compounds, aim of the present study was first to evaluate the genotoxic potential of citral (25, 50 and 100 µg/mL) and eugenol (0.31, 0.62, 1.24 and 2.48 µg/mL) at different times after exposure (6, 10, 24 and 30 h), and then, their ability to modulate DNA damage induced by doxorubicin (DOX) at different treatment protocols (pre, post and simultaneous with DOX) and times (12, 24 and 36 h) in mice peritoneal macrophages. In addition, the toxicogenomic potential of citral and eugenol by modulating the expression of *NF-KB1*, *COX-2* and *TNF-α* (related to inflammatory processes) genes in macrophages activated or not by bacterial lipopolysaccharide (LPS) was also investigated. The results showed that both compounds have genotoxic potential. In the case of citral, genotoxicity was observed for the two major concentrations, but only 6h after the exposure. For eugenol, increased DNA damage was detected for all concentrations, in at least one moment of analysis. Related to the antigenotoxicity, both citral and eugenol presented protective effects at different concentrations and treatment protocols, and the more effective activities were detected at simultaneous and pre-treatment, respectively. Analyses of *COX-2*, *NF-KB1* and *TNF-α* expression showed that both compounds did not alter gene expression in inactive macrophages. In activated cells, citral at 100 µg/mL, and at 50 and 100 µg/mL reduced the expression of *COX-2* and *TNF-α*, respectively. Regarding to eugenol, reduced expression of *TNF-α* was detected only for the highest concentration. In conclusion, both citral and eugenol presented chemopreventive activity against DNA damage induced by DOX, and modulated genes related to inflammatory processes. Nevertheless, the use of these compounds for preventive and therapeutic strategies must be viewed with caution, since both citral and eugenol showed ability to induce primary lesions in DNA.

Key words: citral, eugenol, genotoxicity, antigenotoxicity; gene expression modulation

INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas representa a forma mais antiga e difundida de medicação (HALBERSTEIN, 2005). Até o século passado, a maioria dos medicamentos era obtida diretamente de fontes vegetais ou animais. No entanto, com a revolução industrial e o desenvolvimento da química orgânica houve preferência pelos medicamentos sintéticos, devido a fácil obtenção e porque simples modificações estruturais possibilitam a produção de drogas mais ativas e seguras (RATES, 2001). Apesar disso, parcela significativa da população ainda prefere o tratamento à base de ervas, movimentando um mercado internacional altamente lucrativo. Entre os países da América Latina, o Brasil, a Argentina e o México desempenham papel importante no mercado de ervas medicinais. No Brasil, em 2007, esse mercado rendeu cerca de 160 milhões de dólares (WHO, 2008; SAHOO *et al.*, 2010). Além disso, dentre as drogas prescritas no mundo, aproximadamente 25% são direta ou indiretamente derivadas de plantas. Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente originárias de plantas (RATES, 2001).

Os fitoterápicos, medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, apresentam como vantagens a melhor compatibilidade com o organismo humano, poucos efeitos colaterais, além de serem de menor custo (ARORA *et al.*, 2010). O elevado consumo desses produtos deve-se, em parte, à crença de que o “natural” é relacionado ao “seguro”. Entretanto, os fitoterápicos podem ser tóxicos, e como todos os medicamentos, podem apresentar efeitos colaterais (WHO, 2004). Esses efeitos adversos estão geralmente relacionados à má qualidade da matéria prima, adulteração do composto inicial, inadequada identificação do produto final, dose incorreta, interações com medicamentos convencionais e contaminação com substâncias potencialmente perigosas, como metabólitos microbianos, metais tóxicos e contaminantes químicos e radioativos (KOSALEC *et al.*, 2009).

A utilização de produtos naturais deve vir, portanto, acompanhada por uma rígida fiscalização, uma vez que seus mecanismos de ação podem ser influenciados pelas doses utilizadas, vias de metabolização no organismo e pelas interações químicas (DE FLORA & FERGUSON, 2005). Sendo assim, as agências reguladoras de muitos países têm o papel de fiscalizar e alertar para a utilização indiscriminada

desses produtos. Em 2001, a Agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) recomendou que produtos que continham alcalóides pirrolizidínicos, como é o caso do confrei (*Symphytum officinale*), fossem removidos do mercado por causarem hepatotoxicidade (FDA, 2001). Em 2002, a mesma Agência alertou sobre o uso de suplementos que continham *Piper methysticum* por estarem relacionados a doenças como hepatite e cirrose (FDA, 2002). No Brasil, a Agência que regulamenta o uso de fitoterápicos, a ANVISA, propõe que para assegurar a qualidade desses produtos é necessário o controle das matérias-primas, desde a extração dos componentes até o produto final, e o controle rigoroso dos materiais de embalagem e da formulação farmacêutica (ANVISA, 2011). Entretanto, além dessa fiscalização, para a seleção de compostos naturais ativos e eficazes são necessários estudos pré-clínicos e clínicos associados à compreensão dos mecanismos farmacológicos (ARORA *et al.*, 2010).

Os medicamentos à base de ervas, contêm diversas estruturas químicas com atividade farmacológica e, dependendo da concentração utilizada, podem atuar como alvos terapêuticos ou tóxicos. Desde o consumo até a eliminação, os produtos naturais estão suscetíveis a interações com drogas sintéticas e suplementos da dieta. Dentre essas possíveis interações destacam-se modificações na absorção, metabolismo, distribuição e excreção (FUGH-BERMAN, 2000; VENKATARAMANAN *et al.*, 2006). De fato, a maioria das interações dos fitoterápicos com as drogas sintéticas é devida à inibição ou indução de enzimas responsáveis pelo metabolismo de drogas e toxinas. Durante a fase I do metabolismo ocorrem a oxidação, hidrólise e redução do composto, gerando metabólitos menos tóxicos e mais hidrofílicos, com maior facilidade para serem excretados. Na fase II, que inclui reações de glicolização, sulfonação, acetilação e metilação, ocorre a diminuição da atividade biológica da droga (MANZI & SHANNON, 2005). Produtos naturais, como a kava-kava (*Piper methysticum*) e a erva de São João (*Hypericum perforatum*), por exemplo, podem interagir com drogas sintéticas por meio da inibição da atividade de enzimas metabolizadoras, como o citocromo P450 (OBACH, 2000; ZOU *et al.*, 2002).

1.2 Estresse oxidativo e inflamação no processo carcinogênico

Considerando as inúmeras propriedades biológicas, certas plantas são consideradas agentes potenciais para a cura e prevenção de doenças que afetam a espécie humana e que apresentam altas taxas de mortalidade, como o câncer e outras doenças crônico-degenerativas (aterosclerose, diabetes, artrite reumatóide, inflamações crônicas, Mal de Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla) (ARORA *et al.*, 2010). Dentre as possíveis causas das doenças crônicas destaca-se o estresse oxidativo em células, tecidos ou órgãos (AMES *et al.*, 1993; STARCEVIC *et al.*, 2003; DURACKOVÁ, 2010). O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos, denominados agentes oxidantes ou espécies reativas de oxigênio, e a sua eliminação por mecanismos preventivos, os agentes antioxidantes. Esse desequilíbrio leva a danos em biomoléculas importantes, como proteínas, lipídeos e o DNA (DURACKOVÁ, 2010).

Os sistemas biológicos estão continuamente expostos a agentes oxidantes, seja pela geração endógena que ocorre durante processos fisiológicos como a defesa contra microorganismos patogênicos, o metabolismo, a proliferação e a indução de morte celular, seja pela exposição exógena a poluentes, radiações, fumaça de cigarro, etc (RAHMAN, 2003; STARCEVIC *et al.*, 2003). Em 1993, AMES *et al.* sugeriram que inúmeras lesões oxidativas são induzidas diariamente no DNA de uma única célula. O estresse oxidativo é, portanto, capaz de gerar instabilidade genômica que pode resultar em mutações, alterações nos padrões de expressão gênica e danos celulares, com sérios prejuízos ao organismo (BOHR, 2002). Dentre as doenças crônicas possivelmente iniciadas a partir dessa instabilidade genômica está o câncer, que é descrito como um processo de múltiplas etapas envolvendo mudanças na estrutura e função da informação genética (MEHTA *et al.*, 2010).

Por ser um processo dinâmico e longo, a carcinogênese é didaticamente dividida em três etapas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é um processo irreversível que envolve eventos intracelulares que resultam em mutação genética. Nessa etapa, carcinógenos ambientais, como por exemplo, os presentes na fumaça do cigarro, induzem uma ou mais mutações, que resultam na ativação de oncogenes e na inativação de genes supressores tumorais. Além disso, agentes intracelulares como espécies reativas de oxigênio, decorrentes do metabolismo

oxidativo normal, e alterações em enzimas metabolizadoras de fase I e II, podem produzir moléculas reativas capazes de induzir danos genotóxicos (SURH, 2003; MEHTA *et al.*, 2010). Diferentemente, a promoção é um processo reversível e mais lento, que se caracteriza pela desregulação de vias de sinalização que normalmente controlam a proliferação celular e a apoptose. Por fim, a etapa de progressão é caracterizada pelo acúmulo de alterações genéticas, angiogênese e desenvolvimento metastático (MEHTA *et al.*, 2010).

Além do estresse oxidativo, algumas formas de inflamação crônica também podem predispor ao câncer. Desde 1863, a hipótese de que o câncer poderia se desenvolver em sítios de inflamação crônica vinha sendo cogitada por Rudolf Virchow, que estabeleceu a relação entre inflamação e carcinogênese a partir da presença de leucócitos em tecidos neoplásicos (BALKWILL & MANTOVANI, 2001). Mais tarde, a associação entre inflamação e câncer passou a ser dividida em duas vias: a via extrínseca, impulsionada por condições inflamatórias ou infecciosas que aumentam o risco de câncer; e a via intrínseca, impulsionada por alterações genéticas que causam inflamação e neoplasia (MANTOVANI *et al.*, 2008). As duas vias resultam na ativação de diversos mediadores moleculares, como os fatores de transcrição NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*), o STAT-3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) e o HIF1 α (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*), que coordenam a produção de mediadores inflamatórios como citocinas, interleucinas (ILs), TNF- α (*Tumor necrosis factor-alpha*), quimiocinas, prostaglandinas e iNOS (*Nitric oxide synthase*) (KUNDU & SURH, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2008). Somando-se a isso, aproximadamente 25% dos casos de câncer estão relacionados à associação entre infecções crônicas e inflamação (HUSSAIN & HARRIS, 2007). Algumas evidências fortalecem essa relação, como por exemplo, a associação entre o *Helicobacter pylori* e o câncer de estômago (LADEIRA *et al.*, 2004), doenças inflamatórias pélvicas e o risco para o câncer de ovário e cólon (LIN *et al.*, 2011) e os vírus das hepatite B e C e o carcinoma hepatocelular (MICHIELSEN *et al.*, 2005).

1.2.1 O papel dos macrófagos

Durante os processos inflamatórios, algumas células do sistema imunológico (neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, mastócitos e

linfócitos) são recrutadas para o local da lesão ou da infecção e podem iniciar a resposta inflamatória (KUNDU & SURH, 2008). Dentre essas, os macrófagos destacam-se como importantes células efectoras, atuando em linhas de defesa contra a invasão microbiana e reconhecendo e eliminando células tumorais (KLIMP *et al.*, 2002; MOSSER & EDWARDS, 2008). Além disso, os macrófagos estão relacionados a funções biológicas como a remodelação tecidual durante a embriogênese, o reparo de ferimentos e a remoção de células senescentes após lesões ou infecções. Os principais mecanismos de ação dessas células envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, processamento e apresentação de antígenos, além do recrutamento de outras células do sistema imunológico (KLIMP *et al.*, 2002; SIVEEN & KUTTAN, 2009). Liberados da medula óssea como monócitos imaturos, os macrófagos circulam pela corrente sanguínea e migram para tecidos como o fígado, pulmão e peritônio, onde sofrem a diferenciação final (SIVEEN & KUTTAN, 2009). Os macrófagos encontrados na cavidade peritoneal, por exemplo, são responsáveis pela primeira linha de defesa contra a invasão de microorganismos, como os *Enterococcus faecium* (LEENDERTSE *et al.*, 2009), além de apresentarem importante papel na fagocitose e recrutamento de leucócitos (TOPLEY *et al.*, 1996).

A atuação dos macrófagos no desenvolvimento de neoplasias é controversa, podendo promover a eliminação de células tumorais ou a estimulação do desenvolvimento tumoral (KLIMP *et al.*, 2002; MOSSER & EDWARDS, 2008). Sabe-se que os macrófagos são altamente suscetíveis a danos oxidativos, devido ao alto percentual de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana plasmática e a alta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O desequilíbrio na produção das ROS pode desencadear alterações na integridade de proteínas e ácidos nucleicos e, consequentemente, promover a ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores tumorais. (MEYDANI *et al.*, 1995; KUNDU & SURH, 2008). A versatilidade dessas células se deve a características fenotípicas adquiridas por meio de diferentes estímulos ambientais (MOSSER & EDWARDS, 2008). Os macrófagos podem ser ativados por duas vias distintas, a ativação clássica (M1) ou a via alternativa (M2). A primeira caracteriza-se por ser desencadeada em resposta a produtos microbianos, como o lipopolisacarídeo (LPS) que está presente na membrana de bactérias gram-negativas e é um dos mais potentes ativadores de

macrófagos. Ativados por essa via, os macrófagos são responsáveis pela morte de microorganismos e de células tumorais e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (MOSSER & EDWARDS, 2008; SICA *et al.*, 2008; KIM & HA, 2009). Por outro lado, a ativação alternativa (M2) é promovida por moléculas anti-inflamatórias, como as interleucinas 4, 10 ou 13, que levam à proliferação celular, angiogênese e remodelação e reparo tecidual (SICA *et al.*, 2008; SIVEEN & KUTTAN, 2009). Devido à semelhança entre o perfil molecular e funcional, os macrófagos associados a tumores (TAM) apresentam fenótipo semelhante a aqueles ativados pela via alternativa (SIVEEN & KUTTAN, 2009), correlacionando-se a piores prognósticos para carcinomas de mama e de bexiga (BINGLE *et al.*, 2002).

1.2.2 Mediadores moleculares

Fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B)

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que pertence a família de fatores de transcrição encontrada em quase todos os tipos de células animais, está envolvido na resposta celular a múltiplos estímulos, como estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultra-violeta, vírus, bactérias, compostos antineoplásicos, dentre outros (MERCÚRIO & MANNING, 1999; AGGARWAL & SHISHODIA, 2006; LUQMAN & PEZZUTO, 2010). Além disso, o NF- κ B está relacionado a processos fisiológicos como a imunidade celular, inflamação, proliferação celular, apoptose e desenvolvimento embrionário (JANSSENS & TSCHOPP, 2006). Até o momento, foram identificadas em mamíferos cinco proteínas pertencentes a família do NF- κ B: a RelA (p65), a RelB, a c-Rel, o NF- κ B1 (p50 e seu precursor p105) e o NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100). Estas proteínas se apresentam na forma de hetero ou homodímeros, sendo o heterodímero p65/p50 o mais abundante na maioria das células (KUMAR *et al.*, 2004; JANSSENS & TSCHOPP, 2006). Todos os membros dessa família de fatores de transcrição são caracterizados pela presença de um longo trecho N-terminal de 300 aminoácidos, denominado domínio homólogo Rel (RHD), que é responsável pela ligação ao DNA, interação com proteínas inibidoras κ B (I κ Bs) e dimerização. Associado a proteínas inibidoras, o NF- κ B mantém-se inativo no citoplasma, pois a interação NF- κ B/I κ Bs mascara o sinal de localização nuclear (JANSSENS & TSCHOPP, 2006).

Existem duas principais vias de sinalização que levam a ativação do NF- κ B: a canônica (clássica) e a não canônica (alternativa) (Figura 1).



Figura 1 - Vias de sinalização do NF- κ B: canônica (a esquerda) e não canônica (a direita). A canônica é desencadeada pela ligação do ligante específico ao receptor, levando à fosforilação do I κ B por meio do complexo IKK (IKK α , IKK β e NEMO), liberando os dímeros do NF- κ B ativos que são translocados para o núcleo; na não canônica a ligação do ligante ao receptor promove a transformação do p100/RelB em p52/RelB por meio da ativação do complexo IKK mediado pela via NIK. No núcleo, os dímeros do NF- κ B ativos irão favorecer a transcrição de genes alvos (adaptada de SRIVASTAVA & RAMANA, 2009).

A primeira é tipicamente ativada por citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) ou patógenos. Nesta via, os dímeros do NF- κ B, como o p65/p50, tornam-se ativos por meio da fosforilação do complexo quinase I κ B (IKK), que contém a ação das subunidades catalíticas quinases (IKK α e IKK β) e a regulação de proteínas não enzimáticas (NEMO). Após a degradação do I κ B, os dímeros do NF- κ B são translocados para o núcleo. A via alternativa, por sua vez, é ativada por um grupo mais restrito de citocinas. Por meio da fosforilação da quinase NIK (*NF- κ B-inducing kinase*), o complexo IKK torna-se ativo e promove a translocação dos dímeros do NF- κ B para o núcleo (SRIVASTAVA & RAMANA, 2009). No núcleo, o NF- κ B ativado pode induzir a expressão de mais de 200 genes, interferindo na supressão da

apoptose, indução da transformação celular, proliferação, invasão, metástase, resistência a quimioterápicos e inflamação. Sendo assim, agentes que promovem a inibição da ativação do NF- κ B tem se tornado alvos terapêuticos promissores (AGGARWAL & SHISHODIA, 2006; LUQMAN & PEZZUTO, 2010).

Particularmente, a subunidade NF- κ B1 (p50) não possui atividade transcricional. Para atuar como fator regulador da transcrição, o p50 deve estar ligado a outras proteínas como a RelA, a RelB e a c-Rel, formando heterodímeros. Por essa razão, suas funções biológicas não são suficientemente estudadas como as os outros membros da família NF- κ B (ZIEGLER-HEITBROCK, 2001; YU *et al.*, 2009), muito embora essa subunidade possua papel relevante nos processos inflamatórios, reprimindo a transcrição do *TNF- α* em macrófagos ativados por LPS (BAER *et al.*, 1998). Além disso, a subunidade NF- κ B1 tem papel importante na mediação de danos causados no fígado, limitando a expressão do *TNF- α* e recrutando células inflamatórias (OAKLEY *et al.*, 2005). Já foi relatado que a deficiência da p50 aumenta a inflamação, a lesão pulmonar e a insuficiência respiratória em pulmão de camundongos com pneumonia (MIZGERD *et al.*, 2003). Além disso, alguns autores mostraram que em resposta ao LPS, macrófagos isolados de camundongos deficientes em p50 apresentam altos níveis de TNF- α e IL-12 e níveis reduzidos de IL-10 (CAO *et al.*, 2006). Foi demonstrando, também, que células hepáticas deficientes para o gene *NF- κ B1* (p50) apresentam expressão inapropriada de vários mediadores proinflamatórios, como a hiper expressão dos genes *MMP-13*, *GM-CSF*, *CCL2*, e *CXCL10* (ELSHARKAWY *et al.*, 2010).

Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Essenciais nos processos inflamatórios, as ciclooxigenases (COX) são responsáveis por converter o ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs). Além disso, seus metabólitos desempenham importante função em múltiplos processos fisiológicos e fisiopatológicos (KOKI & MASFERRER, 2002). São conhecidas duas isoformas da ciclooxigenase: a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) (Figura 2), com marcante diferença na expressão e regulação tecidual (RUSSELL, 2001).

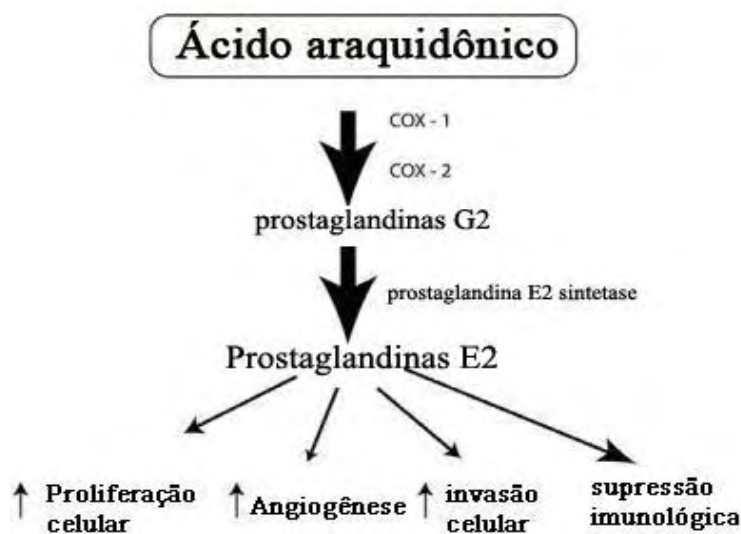


Figura 2 - Mecanismo de síntese da prostaglandina E2 (PGE2) e sua função no desenvolvimento do câncer. As ciclooxygenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) mediam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas G2 (PGG2), enquanto a enzima prostaglandina sintase E converte PGG2 em PGE2. As prostaglandinas contribuem para o desenvolvimento tumoral atuando sobre a proliferação celular, angiogênese, invasão celular e metástase e modulação imunológica (adaptada de DORÉ, 2011).

A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e os produtos desta enzima (prostaglandinas) são importantes para a manutenção de processos fisiológicos como a proteção gástrica e renal e a função plaquetária. A COX-2 normalmente não é detectável na maioria dos tecidos, mas é induzida rapidamente por citocinas, fatores de crescimento, hormônios, processos oncogênicos e durante processos patológicos como as inflamações (RUSSELL, 2001; FARROW & EVERS, 2002; KOKI & MASFERRER, 2002).

Alguns estudos sugerem que os metabólitos da COX-2 podem participar em várias fases da carcinogênese, incluindo a hiperproliferação pré-maligna, a transformação, a manutenção da viabilidade tumoral, o crescimento, a invasão e a disseminação metastática (GOLDEN & ABRAMSON, 1999; TUCKER *et al.*, 1999; RUSSELL, 2001; KOKI & MASFERRER, 2002). Outros mostram a hiperexpressão de COX-2 em tumores de mama, bexiga e próstata (KOKI & MASFERRER, 2002; ARORA *et al.*, 2010). Segundo TUCKER *et al.* (1999), os níveis de RNA mensageiro (RNAm) da COX-2 no pâncreas estão aumentados em mais de 60 vezes nos tecidos neoplásicos em relação aos não neoplásicos adjacentes. Em 2001, CIANCHI *et al.*

demonstraram o envolvimento da COX-2 no câncer colorretal, encontrando níveis elevados da proteína e do RNAm na mucosa do cólon de pacientes. Recentemente, YAO *et al.* (2011) descreveram que a hiporegulação da COX-2 está relacionada à inibição do crescimento de células de carcinoma gástrico.

Fator alfa de necrose tumoral (TNF-alfa)

O fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) é produzido por diferentes tipos celulares, incluindo monócitos, macrófago, linfócitos, células T, células musculares lisas, adipócitos e fibroblastos. O TNF- α desempenha papel crucial na imunidade inata e adaptativa, na proliferação celular e no processo de apoptose. Em condições basais, as células secretam pequena quantidade de TNF- α . Entretanto, o aumento da sua produção ocorre em células estimuladas por citocinas pró-inflamatórias e/ou frente à exposição a lipopolisacarídeos de bactérias gram-negativas (EGAN, 2004; POPA *et al.*, 2007).

As respostas biológicas relacionadas ao TNF- α ocorrem por meio de ligação altamente específica a receptores presentes na membrana de todos os tipos celulares, exceto de eritrócitos. Esses receptores diferem nas suas afinidades de ligação, bem como nas vias de sinalização intracelular, levando a apoptose, a ativação do NF- κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Figura 3) (EGAN, 2004; POPA *et al.*, 2007).

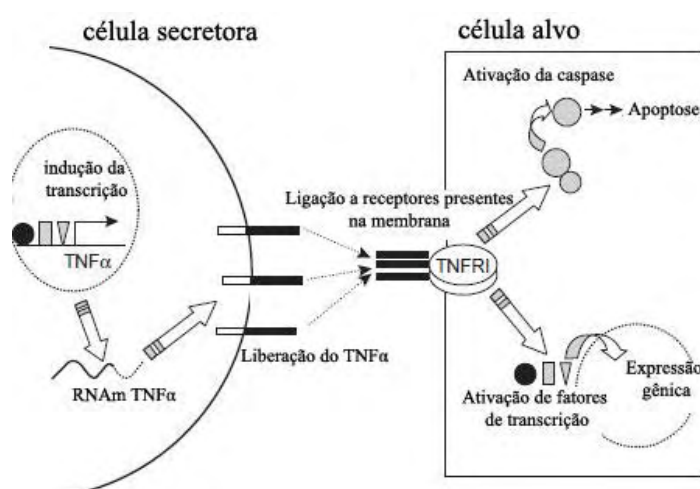


Figura 3 - Modelo de síntese, secreção e estimulação de células alvos pelo TNF- α (adaptada de EGAN, 2004).

A inibição do TNF- α é um mecanismo extremamente eficaz no tratamento de doenças crônicas como a artrite reumatóide e a doença de Crohn. No caso do câncer, a inibição do TNF- α está relacionada à inibição das etapas de promoção e progressão (BALKWILL, 2009). YIN *et al.* (2009) mostraram que o tratamento com TNF- α aumenta o potencial invasivo de células de câncer de mama (MCF-7) e promove alteração na expressão de 39 genes associados à degradação da matriz extracelular, à adesão celular, ao controle do ciclo celular, ao crescimento e à proliferação celular. Além disso, em estudos com células músculo-esqueléticas (C2C12) tratadas com o TNF- α houve aumento dos níveis de RNAm do NF- κ B1 e do NF- κ B2, além de alterações na expressão de genes envolvidos na degradação da matriz extracelular, sinalização do NF- κ B, apoptose, proliferação e diferenciação de células musculares (BHATNAGAR *et al.*, 2010).

1.3 Lesões no DNA e quimioprevenção

Desde a descoberta da estrutura do DNA a mais de 50 anos, os mecanismos para preservar a integridade do genoma vêm sendo amplamente investigados. Lesões no DNA podem bloquear os processos de replicação e transcrição, e, se não reparados ou reparados incorretamente, podem levar a mutações pontuais (alteração de um único par de bases do DNA ou um pequeno número de pares de base adjacentes) ou a aberrações cromossômicas (alterações na estrutura ou número de cópias de cromossomos), comprometendo a viabilidade da célula (GRIFFITHS *et al.*, 2009; JACKSON & BARTEK, 2009).

As lesões no DNA podem ser “espontâneas” ou causadas por agentes endógenos e exógenos. Entre as lesões ocasionadas espontaneamente destacam-se a incorporação errônea de bases durante a replicação e as alterações de bases devido à desaminação e depurinação. Por outro lado, as lesões no DNA causadas por agentes endógenos (espécies reativas de oxigênio provenientes do metabolismo celular normal) e exógenos (p. ex. radiações ionizantes e ultravioletas, compostos presentes no cigarro, alguns vírus e bactérias) podem levar a oxidação de bases e a quebras de fita simples e dupla do DNA. Os agentes antineoplásicos são exemplos de compostos exógenos que promovem lesões no DNA como alquilação de bases, ligações cruzadas e danos oxidativos (CICCIA & ELLEDGE, 2010). Além das lesões

que estão diretamente ligadas a molécula do DNA, outros mecanismos indiretos podem causar genotoxicidade, como é o caso da peroxidação lipídica e dos aductos de proteína. Alterações nas enzimas do sistema de reparo do DNA (p.ex. OGG1, XPD) e de metabolização, no fuso mitótico, no controle do ciclo celular e na apoptose podem também induzir instabilidade genômica (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

Devido à ampla variedade de importantes lesões que podem ocorrer no DNA, as células desenvolveram mecanismos múltiplos e distintos para a reparação desses danos. Apesar de algumas lesões estarem sujeitas à reversão mediada por apenas uma proteína, a maioria dos sistemas de reparo do DNA é realizada por uma sequência de eventos catalíticos mediados por múltiplas proteínas (BOHR, 2002; JACKSON & BARTEK, 2009). Dentre os principais mecanismos de reparo destacam-se: o reparo de erros de pareamento de bases (*mismatch repair*); o reparo por excisão de base, que remove bases incorretas ou danificadas; o reparo por excisão de nucleotídeos, que corrige lesões mais complexas como dímeros de pirimidina e ligações cruzadas; o reparo de junção de pontas não homólogas ou reparo por recombinação homóloga, que repara as quebras de fita dupla do DNA (GRIFFITHS *et al.*, 2009; CICCIA & ELLEDGE, 2010). Além disso, as lesões no DNA podem ser também moduladas por compostos químicos, incluindo aqueles presentes na dieta.

O termo antimutagênese foi originado a partir de estudos em bactérias, que descreviam agentes ou efeitos que, especificamente ou preferencialmente, reduziam a frequência de mutações (CLARKE & SHANKEL, 1975). Visto que as mutações são consideradas a primeira etapa de várias doenças degenerativas (AMES *et al.*, 1993), estudos epidemiológicos têm demonstrado que compostos naturais presentes na dieta podem modular o processo de carcinogênese por meio da indução do sistema de defesa celular incluindo enzimas antioxidantes e do sistema de detoxificação (PANA & HO, 2008). De acordo com WATTENBERG *et al.* (1985), a atuação dos agentes quimioprotetores pode ser dividida em duas categorias: os agentes bloqueadores e os agentes supressores. Os agentes bloqueadores reduzem a formação e a ativação metabólica de carcinógenos que interagem com biomoléculas cruciais (DNA, RNA, proteínas, lipídios), combatem espécies reativas de oxigênio e potencializam o sistema de reparo do DNA. Dessa maneira, tornam-se mais eficazes

quando utilizados de maneira preventiva à exposição dos carcinógenos. Por outro lado, os agentes supressores inibem eventos posteriores à ação do cancerígeno, suprimindo a manifestação da neoplasia. Estes agentes podem inativar oncogenes, ativar genes supressores tumorais, inibir a angiogênese e induzir apoptose por meio de mecanismos que interferem na expressão gênica e reduzem a proliferação de células iniciadas, prevenindo o acúmulo de danos (ARORA *et al.*, 2010).

A ação dos agentes quimiopreventivos ou quimioprotetores, incluindo os de origem natural, tem sido extensivamente estudada nas duas últimas décadas, com especial ênfase para a identificação de compostos com baixa ou nenhuma toxicidade e de fácil acesso para a população humana. Muitos compostos apresentam atividades quimioprotetoras cientificamente comprovadas. Dentre eles destacam-se a curcumina, o resveratrol, o licopeno, o ácido elágico, o eugenol, o indol-3-carbinol, o epigallocatequina-3-galato (EGCG) e o ácido fenil éster caféico (CAPE). Acredita-se que esses levam à supressão do processo inflamatório que poderia desencadear a iniciação da carcinogênese por meio da transformação e hiperproliferação celular (SURH, 2003; AGGARWAL & SHISHODIA, 2006). JONES *et al.* (2005) identificaram 1.600 genes que são modulados em células de câncer de próstata após exposição ao resveratrol, e dentre esses estão genes relacionados à regulação da apoptose, diferenciação e proliferação celular, transdução de sinais, fatores de transcrição, adesão celular e crescimento e supressão tumoral.

1.4 Agentes quimioprotetores

Citral

Compostos monoterpênicos são componentes não nutritivos da dieta, encontrados em óleos essenciais de frutas cítricas e em algumas ervas (NAKAMURA *et al.*, 2003). Dentre esses compostos está o citral, uma mistura natural de dois isômeros monoterpenos aldeído acíclicos (3,7-dimetil-2,6-octadienal): o neral (isômero *cis*) e o geranial (isômero *trans*) (Figura 4). O citral é encontrado em óleos essenciais de diversas plantas, como o capim cidrão, capim limão ou capim santo (*Cymbopogon citratus*), a melissa (*Melissa officinalis*) e a verbena (*Verben officinalis*) (CARLINI *et al.*, 1986; DUDAI *et al.*, 2005).

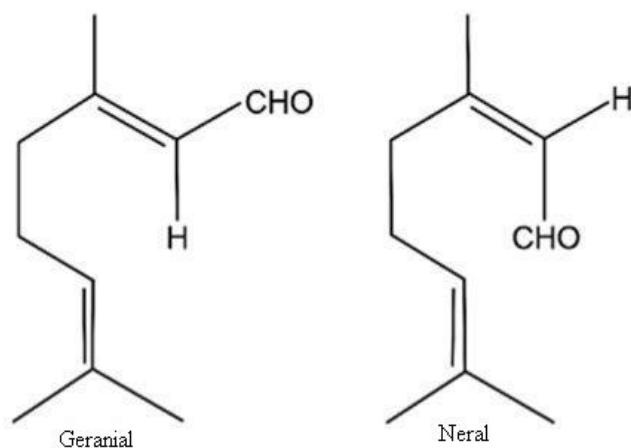


Figura 4 - Estrutura química do citral ($C_{10}H_{16}O$, massa molecular 152,24). Isômeros geométricos geranial (forma trans) e neral (forma cis).

O capim cidrão apresenta cerca de 30% a 93,74% de citral no óleo essencial, sendo o geranial o componente com maior predominância. Devido ao seu aroma característico, o óleo essencial obtido das folhas frescas do capim cidrão é utilizado pelas indústrias de perfumes e cosméticos. Além disso, esta planta é utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento de distúrbios nervosos e gastrointestinais, como analgésico, anti-inflamatório, diurético e sedativo (CARLINI *et al.*, 1986; BARBOSA *et al.*, 2008). Atualmente, dados da literatura mostram os efeitos benéficos do óleo essencial do capim cidrão como atividade sedativa e tranquilizante (BLANCO *et al.*, 2009), ação antiparasitária (SANTORO *et al.*, 2007; SANTIN *et al.*, 2009) e atividade antifúngica (IRKIN & KORUKLUOGLU, 2009; TYAGI & MALIK, 2010). Em estudo recente, BIDINOTTO *et al.* (2010) demonstraram que o tratamento oral de camundongos com o óleo essencial apresentou atividade protetora contra danos no DNA de leucócitos expostos a N-metil-N-nitrosurea. Os mesmos autores, em um experimento de média duração, mostraram que o óleo essencial apresentou atividade supressora de hiperplasias mamárias, embora não tenha reduzido o número de lesões pré-neoplásicas no cólon e na bexiga de camundongos tratados com três drogas indutoras de lesões neoplásicas, o 7,12-dimetil-benz[a]antraceno, a 1,2-dimetilhidrazina e a N-(4-hidroxibutil)nitrosamina.

Já foram também demonstradas as atividades relacionadas aos extratos aquoso e alcóolicos do capim cidrão. A atividade anti-inflamatória do extrato aquoso e do óleo essencial do capim cidrão foi relatada por SFORCIN *et al.* (2009), que

mostraram que esses compostos inibem a produção *in vivo* e *in vitro* de IL-1 β e IL-6 em macrófagos peritoneais de camundongo. Outros estudos demonstraram o efeito quimiopreventivo do extrato etanólico, reduzindo o aparecimento de lesões pré-neoplásicas induzidas pela dietilnitrosamina no fígado de ratos (PUATANACHOKCHAI *et al.*, 2002). Em células de fibroblasto de hamster chins (V79), o extrato hidroalcolico aumentou de modo dose dependente a capacidade de captura de radicais livres e reduziu, significativamente, a frequência de micronúcleos induzidos por 2 Gy de radiação gama (RAO *et al.*, 2009). A atividade antimutagênica do extrato etanólico do capim cidrão foi também demonstrada em linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium* (USANEE *et al.*, 1994).

Como relatado anteriormente, o citral apresenta, também, atividade antifúngica (SADDIQ & KHAYYAT, 2010), antiparasitária (CARDOSO & SOARES, 2010) e anti-inflamatória, inibindo a expressão protéica e o RNA mensageiro da COX-2 e promovendo ativação de receptores nucleares PPAR α e PPAR γ (KATSUKAWA *et al.*, 2010). Em macrófagos de camundogos da linhagem RAW 264.7, estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano, o citral inibiu a fosforilação de I κ B, bloqueando a translocação das subunidades p50 e p65 do NF- κ B e levando a baixa expressão da enzima indutora de óxido nítrico sintetase (iNOS) (LEE *et al.*, 2008). O citral também apresentou efeito quimioprotetor em células de câncer de mama MCF-7, levando a apoptose e a parada no ciclo celular, além de inibir a atividade da COX-2 (CHAOUKI *et al.*, 2009). Em células leucêmicas, o citral induziu a ativação da enzima caspase 3 e a apoptose (DUDAI *et al.*, 2005). Somando-se a isso, este composto apresentou efeito antimutagênico em eritrócitos da medula óssea e do sangue periférico de camundogos *in vivo*, prevenindo alterações cromossômicas e micronúcleos induzidos pela ciclofosfamida, mitomicina C e cloreto de níquel (RABBANI *et al.*, 2005).

Eugenol

A utilização do cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) como medicamento está especialmente relacionada às suas atividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-helmíntica e bactericida; esta última associada principalmente a patógenos orais como as bactérias anaeróbicas gram-negativas (*Porphyromonas gingivalis* e

Prevotella intermedia), frequentemente indutoras de periodontites (CAI & WU, 1996; MIYAZAWA & HISAMA, 2003; ABDEL-WAHHAB & ALY, 2005). Compostos purificados do cravo-da-Índia atenuam o vírus da herpes pela inibição da síntese do DNA viral; o extrato aquoso apresenta efeito inibitório contra o vírus da hepatite C, e a infusão aquosa induziu apoptose durante o processo de carcinogênese pulmonar, reduzindo os níveis da proteína COX-2 e aumentando a expressão da p53 (BANERJEE *et al.*, 2006). Recentemente, RODRIGUES *et al.* (2009) relataram que o extrato hidroalcoólico e o óleo essencial do cravo-da-Índia apresentaram ação anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro*, em macrófagos peritoneais de camundongos, por inibir a produção de IL-1 β e IL-6.

Alguns autores atribuem as atividades benéficas do cravo-da-Índia ao seu composto majoritário, o eugenol (HE *et al.*, 2007; CAMPANIELLO *et al.*, 2010; DEVI *et al.*, 2010). Este (4 allil-2-metoxifenol; Figura 5), é um composto fenólico presente em diversas plantas. Além do cravo-da-Índia, o eugenol pode ser encontrado na canela, na noz-moscada e no manjerição (YOGALAKSHMI *et al.*, 2010). No cravo-da-Índia esse composto representa, respectivamente, cerca de 89,5% e 98% da composição do óleo essencial e do extrato aquoso (RODRIGUES *et al.*, 2009). O eugenol apresenta ampla utilização na indústria de alimentos, como aromatizantes de alimentos, bebidas e doces, em cosméticos e como antiséptico em práticas odontológicas (HAN *et al.* 2007; YOGALAKSHMI *et al.*, 2010).

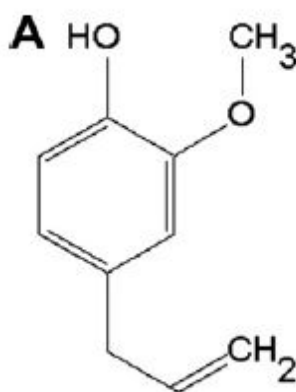


Figura 5 - Estrutura química do eugenol (C₁₀H₁₂O₂, massa molecular 164.20).

A ação quimioprotetora do eugenol foi demonstrada por LEE *et al.* (2007), que observaram a atividade anti-inflamatória do composto a partir da inibição da

expressão da IL-1 β , do TNF- α e da COX-2 em macrófagos humanos induzidos por LPS. Atividade semelhante foi descrita por MAGALHÃES *et al.* (2010), detectando a inibição da produção do TNF- α e da ativação do NF-kB em lavado de fluidos broncoalveolares de camundongos estimulados com LPS. Para as atividades genotóxica e/ou antigenotóxica do eugenol, contudo, os resultados são contraditórios. MARALHAS *et al.* (2006) observaram aumento de aberrações cromossômicas em células V79 de hamster chinês tratadas com eugenol; efeito genotóxico foi também descrito para células de ovário de hamster chinês (AA8) (MARTINS *et al.*, 2010). No entanto, ROMPELBERG *et al.* (1996) demonstraram que o eugenol reduziu a mutagenicidade do benzo(a)pireno em células de fígado de ratos. Atividade antimutagênica também foi relatada por ABRAHAN (2001), que observaram a redução da frequência de micronúcleos induzidos pela ciclofosfamida, pela procarbazina e pelo metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina em camundongos. Além disso, o tratamento *in vitro* de macrófagos peritoneais com o eugenol reduziu a fragmentação do DNA provocada pela nicotina (MAHAPATRA *et al.*, 2009a). Recentemente, YOGALAKSHMI *et al.* (2010) também reportaram que o tratamento com o eugenol preveniu quebras de fitas simples no DNA induzidas pela tioacetamida em células do sangue periférico de ratos.

A ação de compostos fenólicos como o eugenol pode ser dependente das características do ambiente em que se encontram (pH e solubilidade). Por exemplo, esses compostos podem atuar como agentes antioxidantes em baixas doses e pró-oxidantes em altas doses (ATSUMI *et al.*, 2001; FUJISAWA *et al.*, 2002; SAKIHAMA *et al.*, 2002). De acordo com ATSUMI *et al.* (2005), o tratamento de células de adenocarcinoma submandibular humano com o eugenol induz a formação de baixas taxas de espécies reativas de oxigênio. No entanto, o eugenol comporta-se ora como antioxidante, ora como pró-oxidante em células expostas ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio ou pela radiação com luz visível. Recentemente, YOGALAKSHMI *et al.* (2010) demonstraram o potencial antioxidante do eugenol, levando a diminuição da peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas e de marcadores inflamatórios, quando células de fígado de ratos foram tratadas com a tioacetamida.

1.5 Métodos para avaliações toxicogenéticas

Considerando a estreita relação entre eventos genotóxicos e inúmeras doenças, faz-se necessária a realização de testes que permitam a identificação de agentes com potencial indutor e/ou protetor de alterações genéticas. Dentre os testes propostos pelas agências reguladoras para a avaliação da mutagenicidade/genotoxicidade destacam-se os ensaios de mutação gênica em bactérias e de mutação e/ou danos cromossômicos em células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*. Para a maior sensibilidade, os ensaios devem ser complementares, ou seja, avaliarem diferentes efeitos (ELLINGER-ZIEGELBAUER *et al.*, 2009; ZEIGER, 2010). Assim sendo, outros testes são também utilizados como é o caso do teste UDS (*unscheduled DNA synthesis*), para a mensuração de reparo de DNA, e o teste do cometa, para detecção de quebras de fitas de DNA (MÜLLER *et al.*, 1999).

O teste do cometa apresenta vantagens como a detecção de baixos níveis de danos no DNA, a necessidade de pequena amostra de células, o baixo custo e o curto período para a sua realização (TICE *et al.*, 2000) (figura 6). Com o objetivo de aumentar a especificidade da técnica, algumas modificações vêm sendo introduzidas na técnica originalmente descrita. Alterações nas condições de eletroforese, por exemplo, permitiram ampliar o espectro de lesões detectáveis no DNA (quebras de fita simples de DNA e de sítios álcali-lábeis), enquanto a adição de enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos permitiu a identificação de danos oxidativos na molécula (TICE *et al.*, 2000; COLLINS, 2004). Assim sendo, o teste do cometa possui aplicação para a identificação de agentes genotóxicos, para o biomonitoramento humano e ambiental e para pesquisas sobre o sistema de reparo no DNA (HENDERSON *et al.*, 1998; COLLINS, 2004).



Figura 6 - Nucleóides corados com Syber Gold. Imagens obtidas com o software Comet Assay IV (Perceptive Instruments), em aumento de 400X.

Nos delineamentos experimentais que utilizam o teste do cometa para a identificação de agentes genotóxicos e antigenotóxicos é fundamental a inclusão de controles negativo (solvente ou veículo) e positivo (metil-metanossulfanado, 4-nitroquinolina-N-óxido) (TICE *et al.*, 2000). A doxorubicina (DOX), pertencente à família das antraciclinas, com aplicação no tratamento de linfomas agressivos, tumores sólidos, sarcomas de tecido mole e cânceres de mama, tem sido utilizada como controle positivo do teste do cometa devido ao seu mecanismo de ação que inclui: 1) a intercalação com a molécula de DNA e/ou a inibição da atividade da polimerase, levando à inibição da síntese de macromoléculas; 2) a indução de danos no DNA por meio da inibição da topoisomerase II; 3) a formação de aductos de DNA e “cross-linking”; 4) a interferência na separação das fitas de DNA e sobre a helicase; 5) efeitos sobre a membrana celular; 6) a geração de radicais livres; 7) a indução de apoptose por meio da interação com a proteína p53 (GEWIRTZ, 1999; MINOTTI *et al.*, 2004).

A Toxicogenômica, que agrega novas tecnologias à toxicologia convencional para o estudo das interações gene-ambiente, visa a avaliação em larga escala de RNAs mensageiros (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica) (SUTER *et al.*, 2004; OBEREMM *et al.*, 2005). Para o estudo de expressão gênica, a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR-RT) tem sido o método de escolha quando o objetivo requer especificidade, sensibilidade e quantificação reprodutível de RNAm em um procedimento simples e rápido. Nessa metodologia, após a transformação do RNAm em DNA complementar (cDNA) pelo uso da transcriptase reversa, o produto é submetido a amplificação exponencial por reação de PCR. Posteriormente, por meio de marcações com sondas que emitem fluorescência ou corantes intercalantes (SYBR Green), torna-se possível a detecção dos transcritos de RNAm sem a necessidade de procedimentos pós amplificação como eletroforese em gel ou *southern blotting* (BUSTIN, 2000).

OBJETIVOS

Considerando o potencial antioxidante e anti-inflamatório do citral e do eugenol e a ampla utilização de plantas com esses compostos majoritários na medicina popular, o presente estudo objetiva investigar o potencial genotóxico do citral e do eugenol, bem como seus possíveis efeitos moduladores sobre danos quimicamente induzidos no DNA e sobre o padrão de expressão de genes relacionados ao processo inflamatório.

São objetivos específicos do estudo:

- avaliar, pelo teste do cometa, a genotoxicidade do citral e do eugenol em macrófagos peritoneais de camundongos;
- avaliar o potencial quimioprotetor desses compostos sobre a ação genotóxica da doxorrubicina, em três protocolos distintos de tratamento (antes, após e simultaneamente à doxorrubicina);
- investigar, por qPCR-RT, alterações na expressão dos genes *NF-kB1*(p50), *COX-2* e *TNF- α* após tratamentos com o citral e o eugenol;
- avaliar a influência desses compostos sob a modulação da expressão dos genes *NF-kB1*(p50), *COX-2* e *TNF- α* frente ao tratamento simultâneo com lipopolisacarídeo bacteriano (LPS).

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de macrófagos peritoneais de camundongo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Protocolo 818.

A cultura de células foi estabelecida a partir de lavado peritoneal de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, com peso entre 15 e 20 g e de 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, sob condições controladas de temperatura e ciclos de luz 12 h claro/escuro. Para a coleta do material biológico, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, posicionados em decúbito dorsal e higienizados com álcool 70% para posterior incisão na região abdominal a fim de expor a cavidade peritoneal. Com o auxílio de uma seringa estéril, foram injetados 8ml de meio RPMI 1640 (Cultilab) gelado na cavidade peritoneal e, após leve massagem abdominal de 30 segundos, o líquido peritoneal foi coletado e transferido para tubo *Falcon* estéril e armazenado em gelo. Este procedimento foi repetido de 3 a 4 vezes em cada animal.

Para o processamento das células, o lavado peritoneal foi centrifugado a 1.500 rpm, durante 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de meio completo (meio RPMI 1640 - Cultilab, suplementado com 10% de soro fetal bovino - Cultilab) com 0,5% de antibiótico (penicilina 10.000 U.I./ mL e estreptomicina 10 mg/mL-Cultilab). Aproximadamente 2×10^5 células foram colocados em cada poço da placa de microcultura de 96-wells e incubadas a 37°C em tensão de 5% de CO₂. Após 2 horas, as células não aderentes foram removidas (ZHANG *et al.*, 2008).

3.2 Compostos-teste: citral e eugenol

O citral, isolado do capim limão, foi fornecido pelo Prof. Dr. José Maurício Sforcin, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP. O eugenol foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich. Para a realização dos experimentos, os dois compostos foram diluídos em meio de cultura completo. Como controle positivo (agente genotóxico) para o teste do cometa foi

utilizado o cloridrato de doxorrubicina (DOX) do Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo LTDA (Rubidox) e da Sigma-Aldrich. Como agente indutor de inflamação para as análises de expressão gênica foi utilizado lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) da Sigma-Aldrich

3.3 Teste de viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o teste do azul de tripano que se baseia na integridade da membrana: as células com membrana danificada coram-se em azul e aquelas com a membrana íntegra não se coram. Quando os tratamentos induziram porcentagem de células viáveis inferiores a 75% foram descartados (ANDERSON *et al.*, 1998).

Para a avaliação da citotoxicidade do citral foram testadas as concentrações de 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL; para o eugenol foram testadas as concentrações de 0,62, 1,24, 2,48 e 4,96 µg/mL. Essas concentrações foram definidas a partir de estudos anteriores realizados no Laboratório de Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP. Para isso, aproximadamente 2×10^5 células foram tratadas com os compostos em placa de microcultura, por 6 horas (TICE *et al.*, 2000). Ao final desse período, as culturas foram lavadas por 2 vezes, foram acrescentados 100 µl de meio completo em cada poço e as culturas reincubadas em estufa de CO₂ a 37 °C, por 4h. A coleta das células foi feita utilizando 100 µL de solução Hyqtase (HyClone). As suspensões celulares resultantes foram transferidas para microtubos previamente identificados, que, posteriormente, foram centrifugados a 1.500 rpm por 10 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi removido e 10 µl da suspensão celular foram homogenizados com 10 µl de azul de tripano a 0,4% (Hyclone). Em seguida, foi feita a contagem das células em câmara de *Neubauer*.

Nos testes de antigenotoxicidade do citral e do eugenol, as três concentrações que apresentaram viabilidade celular superior a 75% foram combinadas com a DOX em três tratamentos distintos: pré, pós e simultaneamente ao agente genotóxico. A coleta das células foi realizada nos momentos 12, 24 e 36 horas. O controle positivo DOX (Rubidox) foi utilizado na concentração de 1 mg/mL nos experimentos de genotoxicidade com o eugenol. Para os experimentos de

genotoxicidade com o citral e de antigenotoxicidade com ambos os compostos a DOX (Sigma) foi utilizada na concentração de 34 µg/mL.

3.4 Teste do cometa

3.4.1 *Análise do potencial genotóxico do citral e do eugenol*

As células peritoneais isoladas conforme descrito anteriormente, foram incubadas durante 6 horas, a 37°C, na presença do citral ou do eugenol, nas respectivas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, e de 0,31, 0,62, 1,24 e 2,48 µg/mL (concentrações que resultaram em mais de 75% de viabilidade celular). Após esse período, as células foram lavadas 2 vezes com meio RPMI para uma coleta imediata (6 horas), enquanto nos demais poços da placa de cultivo foram adicionados 100µL de meio completo. As células foram novamente incubadas para posteriores coletas em três diferentes momentos 10, 24 e 30 horas (Figura 7).

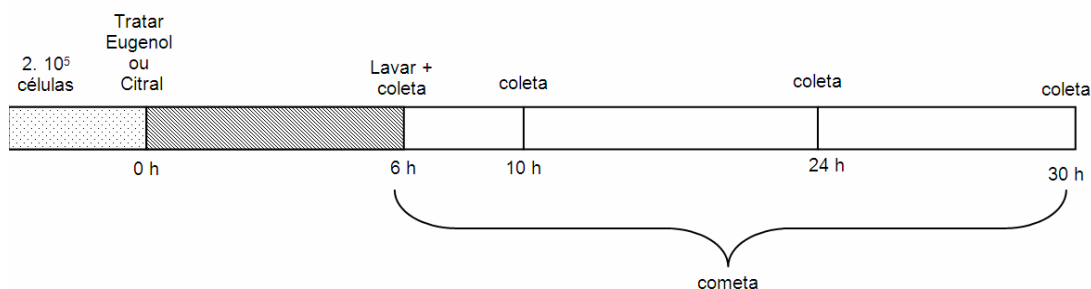


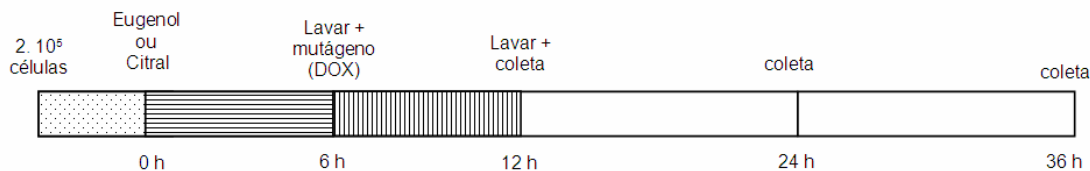
Figura 7 - Delineamento experimental para o ensaio de genotoxicidade.

3.4.2 *Análise do potencial antigenotóxico do citral e do eugenol*

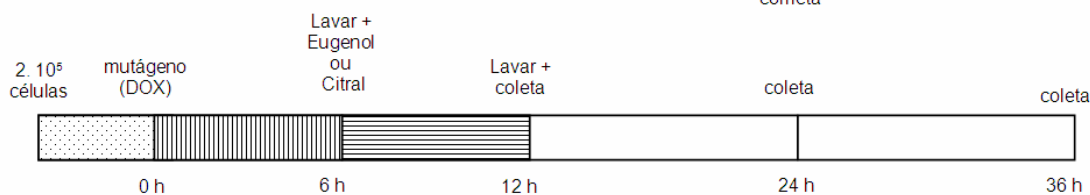
Para a avaliação do potencial quimioprotetor do citral e do eugenol, os macrófagos peritoneais aderidos à placa de cultura foram submetidos a três protocolos de tratamento: pré-tratamento, ou seja, exposição inicial ao composto-teste e posterior à DOX; pós-tratamento, com exposição primária a DOX e posterior ao composto-teste; e tratamento simultâneo, com exposição simultânea ao composto-teste e a DOX. O citral e o eugenol foram utilizados nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL e de 0,31, 0,62, 1,24 e 2,48 µg/mL, respectivamente. A DOX foi

utilizada na concentração de 34 µg/mL. Após os períodos de tratamento, as células foram lavadas 2 vezes com meio RPMI e coletadas imediatamente (12 horas) e nos momentos 24 e 36 horas (Figura 8).

Pré tratamento



Pós tratamento



Tratamento simultâneo

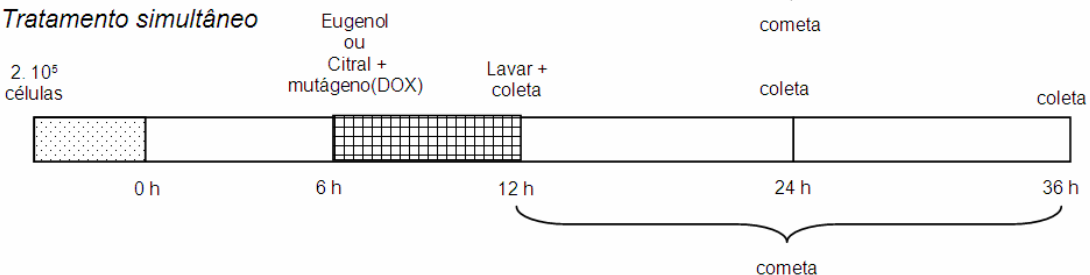


Figura 8 - Delineamento experimental para ensaios de antigenotoxicidade do citral e do eugenol. Protocolos de tratamento pré, pós e simultâneo à doxorrubicina (mutágeno - controle positivo).

3.5 Processamento das células para o teste do cometa

O teste do cometa foi conduzido conforme a metodologia descrita por SINGH *et al.* (1988) e TICE *et al.* (2000). Após retirada da placa de cultura, a suspensão de células foi transferida para microtubos estéreis de 1,5mL e posteriormente centrifugada a 1.500 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento celular foram adicionados 110 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (37°C); o volume final foi transferido para uma lâmina de microscopia previamente recoberta com uma fina camada de agarose de ponto de fusão regular (1,5%). Esta lâmina foi coberta com lamínula (24 x 60) e deixada a 4°C, durante 5

minutos, para solidificação da agarose. Em seguida, a lamínula foi cuidadosamente removida e a lâmina colocada em solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, lauril sarcosinato de sódio a 1%; Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%) e protegida de luz, durante aproximadamente 24 h em geladeira. Após essa etapa, as lâminas foram colocadas em solução de PBS por 5 minutos e, então, transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese, que foi preenchida com tampão alcalino gelado e recém preparado (1mM EDTA e 300 mM NaOH, pH>13). Após o período para a desespiralização do DNA e expressão dos sítios álcali-lábeis (20 minutos), a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 20 minutos. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram colocadas durante 15 minutos em solução de neutralização (0,4 M de Tris, pH 7,5), fixadas com etanol absoluto e secas a temperatura ambiente. Todo o procedimento foi realizado sem a exposição direta de luz. Para a análise, as lâminas foram coradas com 75µL de Syber Gold (Life Technologies) na concentração de 1 (Syber Gold): 10.000 (H₂O MilliQ), cobertas com lamínula e os nucleóides analisados em microscópio de fluorescência (aumento de 400X) acoplado a sistema de análise de imagem (Comet Assay IV - Perceptive Instruments, UK). Foram analisados 50 “nucleóides” por lâmina e como parâmetro para avaliação dos níveis de danos no DNA foi considerado o *tail intensity* (quantidade de DNA na cauda). O teste foi realizado em triplicata, com lâminas codificadas e analisadas em teste cego.

3.6 Análise da expressão dos genes *NF-kB1* e *COX-2* por PCR quantitativa em tempo real (qPCR-RT)

Para as análises de expressão gênica foram utilizadas as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL para o citral e 0,31, 0,62, 1,24 e 2,48 µg/mL para o eugenol. Inicialmente, os macrófagos peritoneais foram expostos aos compostos isolados (citral ou eugenol) durante 6 horas a 37°C (Figura 9A). Posteriormente, as células foram tratadas simultaneamente com os compostos (citral ou eugenol) e o estímulo inflamatório (LPS 50 µg/mL) (Figura 9B).

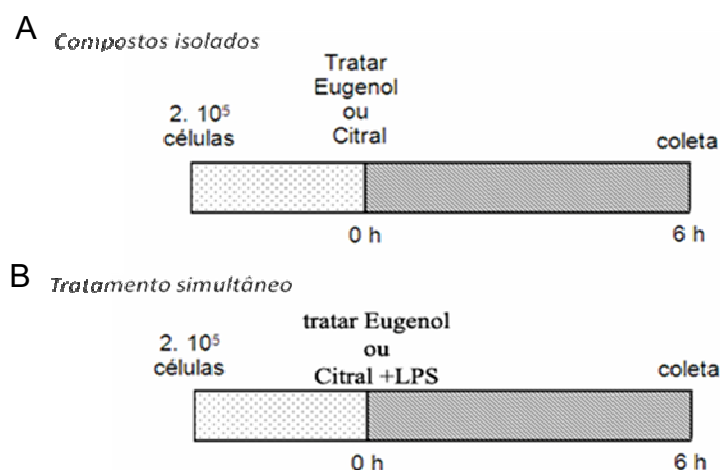


Figura 9 - Delineamento experimental para a análise de expressão gênica após tratamento com citral ou eugenol: A - protocolo de tratamento com os compostos isolados; B - protocolo de tratamento simultâneo com citral ou eugenol e o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).

Após o final do tratamento ($t = 6$ h), as células foram coletadas e o RNA isolado com o *kit RNeasy Mini* (Qiagen®), segundo instruções do fabricante. Posteriormente, a concentração e a pureza do RNA foi determinada em espectrofotômetro (NanoVue - GE) e, em seguida, o RNA foi armazenado a -80°C . O cDNA foi confeccionado a partir de $0,1 \mu\text{g}$ de RNA, utilizando-se a enzima transcriptase reversa do *kit High Capacity* (Applied Biosystems – ABI, USA), segundo protocolo do fabricante. A reação foi incubada a 25°C por 10 min, posteriormente a 37°C por 120 min e, então, permaneceu a 4°C . Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C .

Os ensaios de expressão gênica TaqMan® (*Applied Biosystems*™) para os genes-alvos *NF-kB1* (ensaio: Mm 00476379_m1), *COX-2* (ensaio: Mm 00478372_m1) e para os genes endógenos gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e β -actina (*ACTB*) foram marcados com sondas contendo um corante repórter fluorescente (FAM) na extremidade 5' e um corante *quencher* (MGB) na extremidade 3'. Para o gene *TNF- α* , foi utilizado o ensaio de expressão gênica *Custom TaqMan*®, que foi customizado utilizando-se sondas contendo um corante repórter fluorescente (FAM) na extremidade 5' e um corante *quencher* (TAMRA) na extremidade 3'. As sequências de *primers* e sonda estão descritas a seguir:

Forward primer 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3' a 500nM;

Reverse primer 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3' a 500nM;

Sonda 5'-CACGTCGTAGCAAACCACCAAGTGGA-3' a 200nM.

Para a escolha do melhor controle endógeno foi utilizado o algoritmo geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). O *GAPDH* foi o escolhido por apresentar menor variação de expressão entre os diferentes tratamentos. Para verificar a eficiência dos *primers*, foram feitas curvas padrão. Os *primers* para *β -actina*, *GAPDH*, *NF- κ B1*, *COX-2* e *TNF- α* apresentaram eficiências superiores a 90%. A amplificação foi realizada utilizando-se o *kit Master Mix Taqman Universal FAST* (ABI). A amplificação e a quantificação em tempo real foram realizadas em termociclador ABI Prism 7500 Fast, com os seguintes parâmetros de amplificação para todos os genes, com exceção do *TNF- α* : desnaturação a 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 3 segundos, e 60°C por 30 segundos. Os parâmetros para o *TNF- α* foram: desnaturação a 94°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 segundos, e 60 °C por 1 min. Em cada placa foi adicionada um controle negativo (sem DNA complementar) em duplicata para garantir que não houvesse contaminação. Como amostra para calibração foi utilizado um *pool* de células de antes do tratamento.

Os valores do CT (ciclo *threshold*; número do ciclo no qual a fluorescência passa pelo crescimento exponencial) foram normalizados com o corante de referência passiva ROX, que compensa pequenas variações do sinal, resultando em melhor precisão. Para a quantificação relativa da expressão gênica foi utilizado o método CT Comparativo ($\Delta\Delta CT$), que se fundamenta na fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que o $\Delta\Delta CT$ = média do ΔCT (grupo tratado) - média do ΔCT (grupo calibrador). O ΔCT é a diferença entre o CT do gene de interesse e o CT do gene endógeno. Para cada amostra foi realizada uma quantificação relativa (QR) em comparação à amostra controle calibradora (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

3.7 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos pelo teste do cometa foram avaliados utilizando-se o *software* SAS, v.9.2. Por não apresentarem distribuição normal, os dados foram normalizados com base na distribuição gama e as análises realizadas de acordo com modelo generalizado de distribuição GENMOD. Para a elaboração dos gráficos foi utilizado o GraphPad Prism 5.0. Para os resultados obtidos na avaliação da expressão gênica foi utilizada a análise de variância com um fator seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Foram consideradas significativos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.1 Viabilidade Celular

As concentrações de citral e eugenol utilizadas no teste do cometa foram determinadas a partir de testes de viabilidade celular. As concentrações que apresentaram viabilidade superior a 75% foram 25, 50 e 100 µg/mL para o citral e de 0,62, 1,24 e 2,48 µg/mL para o eugenol (Figura 10).

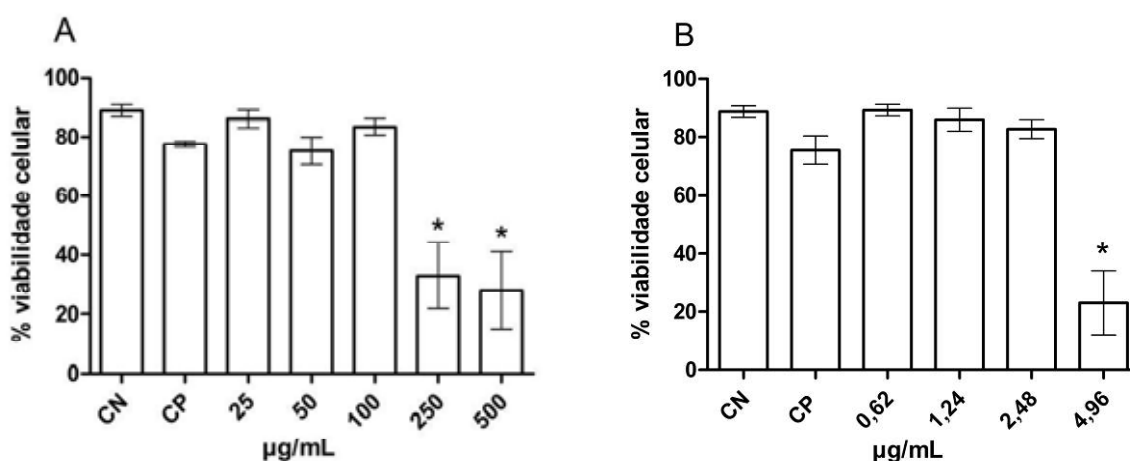


Figura 10 - Viabilidade celular (% de macrófagos viáveis), compostos isolados. As células foram tratadas por 6 horas com diferentes concentrações (µg/mL) de: A) citral e B) eugenol. CP: controle positivo, doxorrubicina -Sigma (34 µg/mL) para o citral e Rudodox® (1 mg/mL) para o eugenol; CN: controle negativo. Os resultados são expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes; * concentrações que apresentaram viabilidade celular inferior a 75% e $p < 0,05$ em relação ao CN.

Os resultados da viabilidade celular após a combinação do citral ou eugenol com a doxorrubicina (DOX) são apresentados, respectivamente, nas Figuras 11 e 12. Todos os tratamentos apresentaram viabilidade celular superior a 75%.

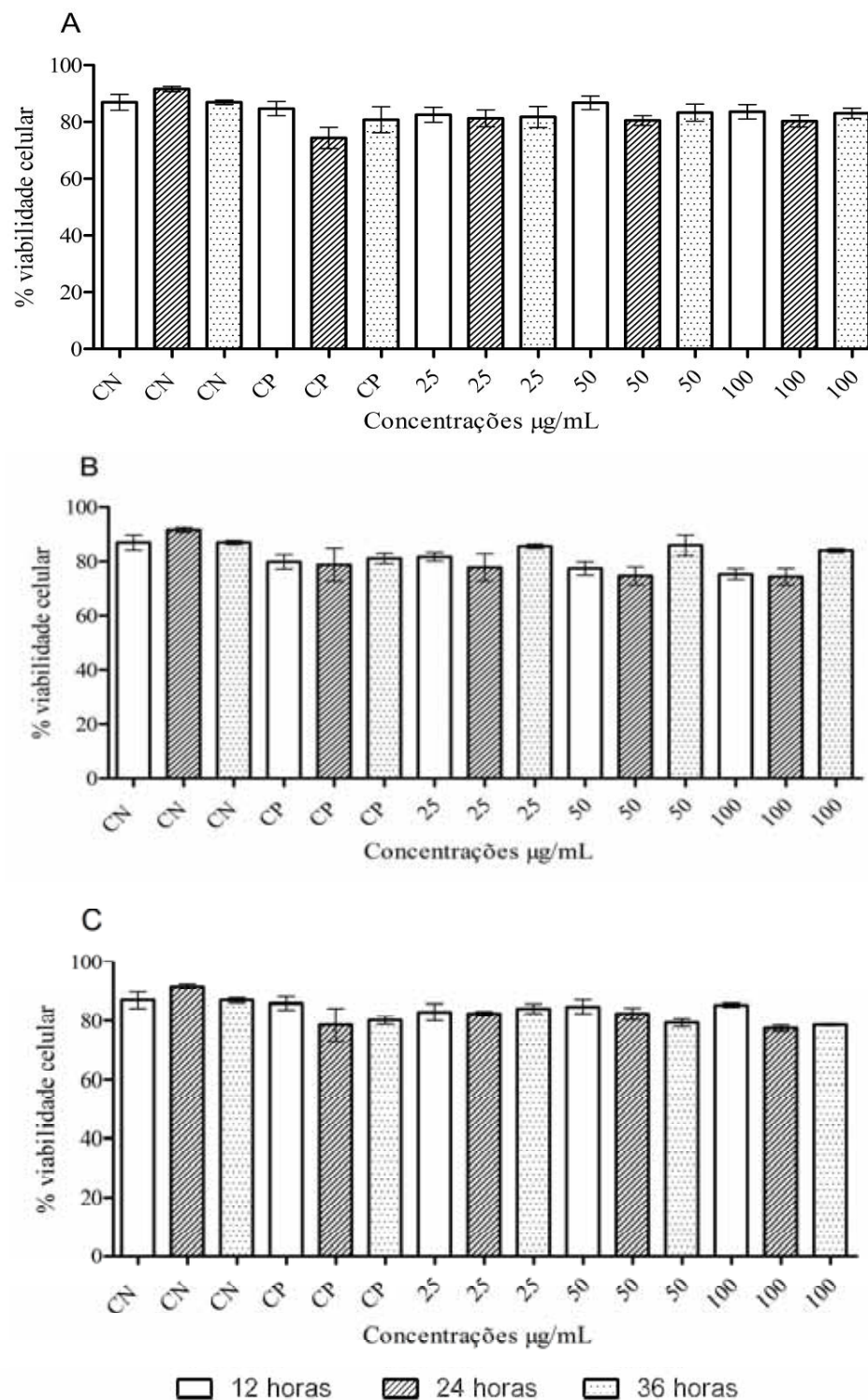


Figura 11 - Viabilidade celular (% de macrófagos viáveis), macrófagos expostos ao citral em três protocolos de tratamento distintos: A – antes da doxorrubicina (DOX; pré-tratamento); B – após a DOX; C - simultaneamente a DOX; CP - controle positivo (DOX = 34 µg/mL); CN - controle negativo. As células foram coletadas nos momentos 12, 24 e 36 horas. Os resultados são expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes.

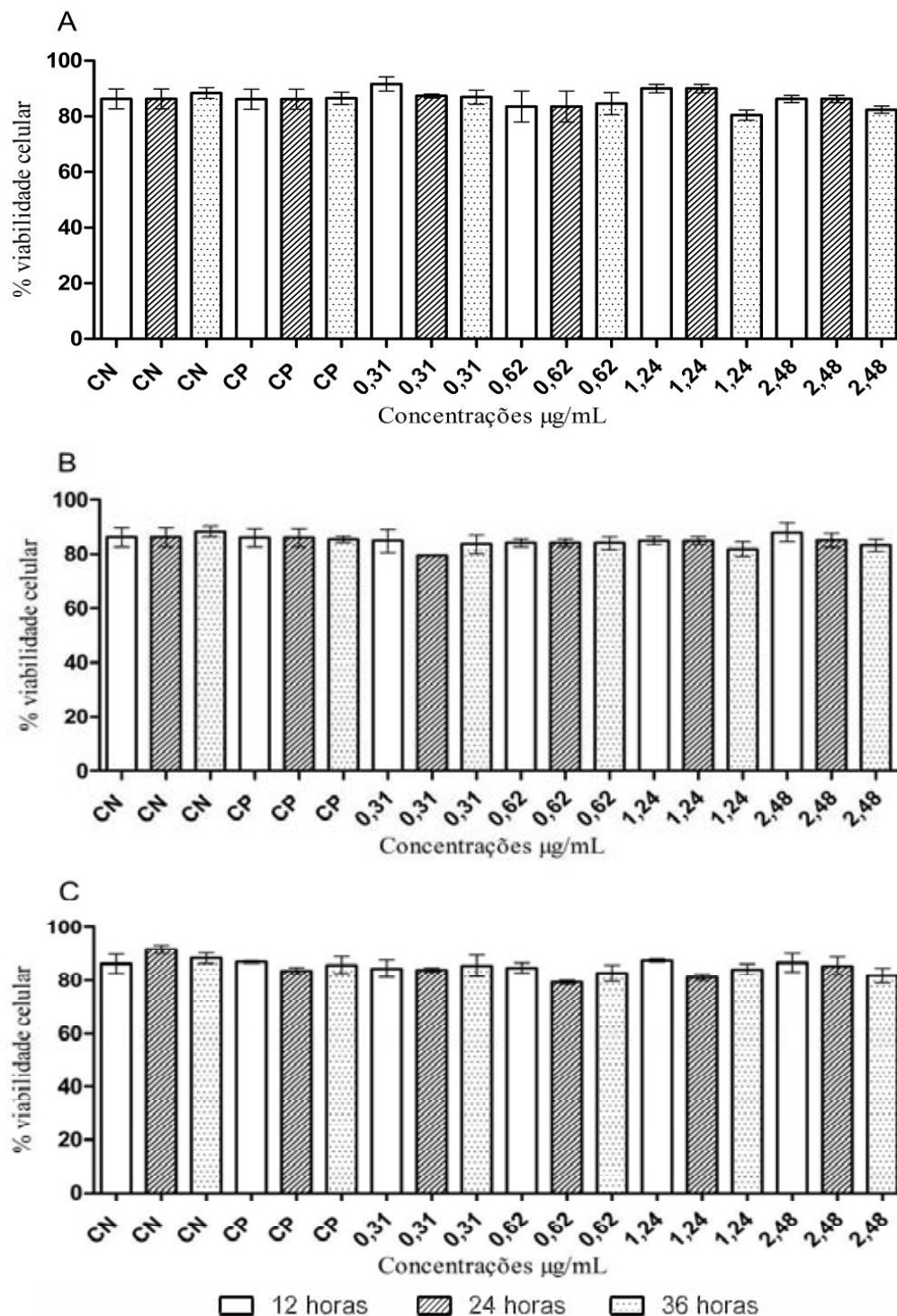


Figura 12 - Viabilidade celular (% de macrófagos viáveis). macrófagos expostos ao eugenol em três protocolos de tratamento distintos: A – antes da doxorrubicina (DOX; pré-tratamento); B – após a DOX; C - simultaneamente a DOX; CP - controle positivo (DOX = 34 µg/mL); CN - controle negativo. As células foram coletadas nos momentos 12, 24 e 36 horas. Os resultados são expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes.

4.2 Genotoxicidade

Os dados sobre a genotoxicidade do citral estão apresentados na Figura 13 e na Tabela 1 (anexa). Foi observado aumento significativo de danos no DNA (*tail intensity*) apenas quando as células foram expostas às duas menores concentrações do citral (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e analisadas imediatamente após o término do tratamento ($t = 6\text{h}$).

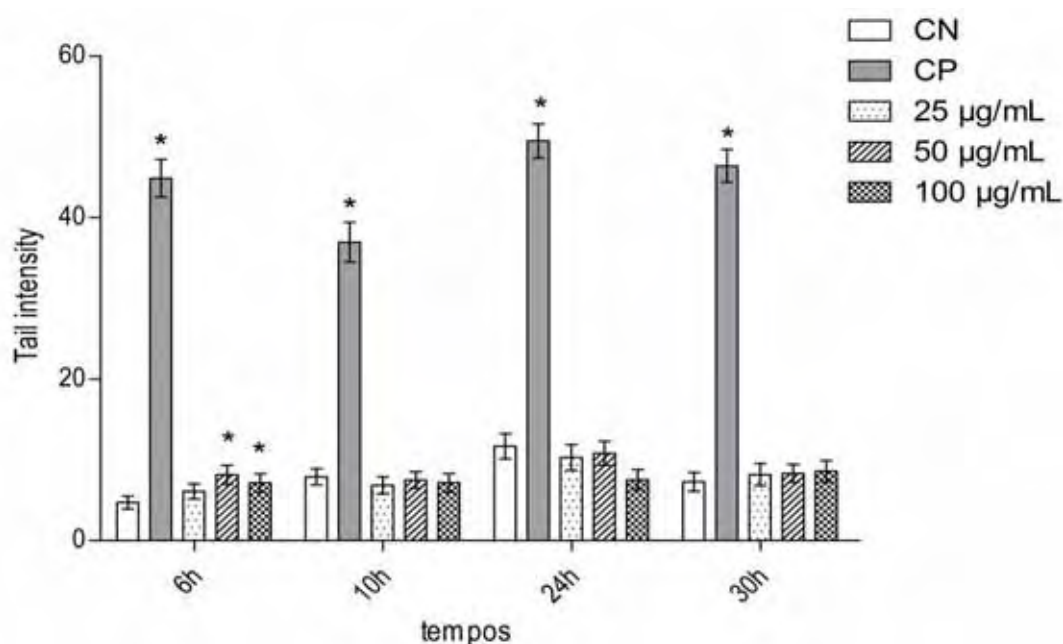


Figura 13 - Danos no DNA (*tail intensity*) em macrófagos peritoneais de camundongo tratados *in vitro* com o citral em três diferentes concentrações e analisados nos momentos 6, 10, 24 e 30 horas. CN: controle negativo; CP: controle positivo (doxorrubicina Sigma - 34 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados são expressos como média e erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo

A Figura 14 e a Tabela 2a (anexa) mostram os níveis de danos no DNA dos macrófagos tratados com o eugenol (0,62, 1,24, e 2,48 $\mu\text{g/mL}$). Exceto no tempo de 24 horas, em todos os momentos de análise foram observados aumentos significativos ($p < 0,05$) de danos no DNA para pelo menos duas das concentrações testadas.

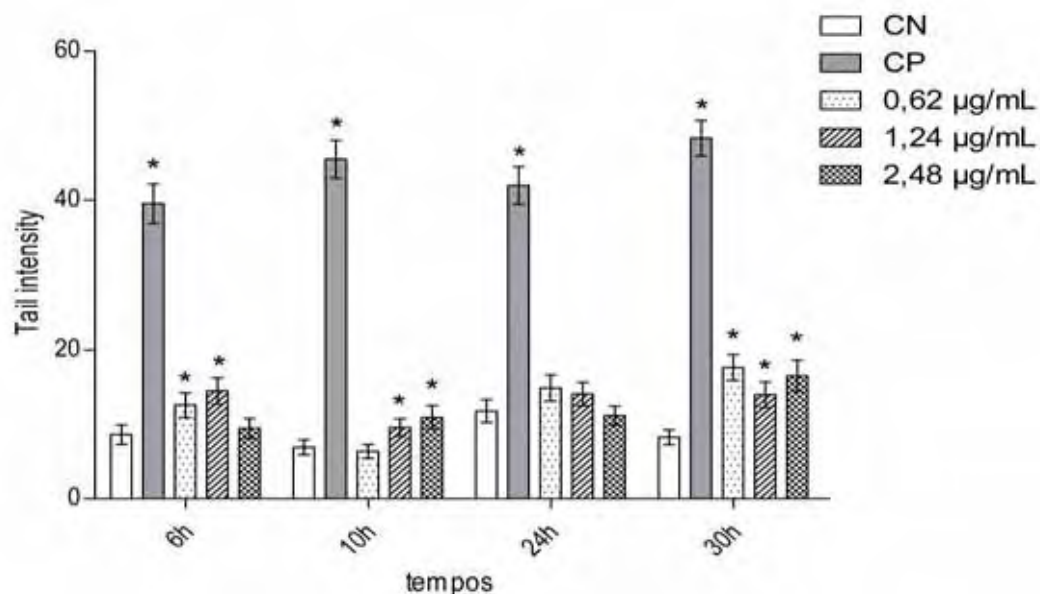


Figura 14 - Danos no DNA (*tail intensity*) em macrófagos peritoneais de camundongo tratados *in vitro* com o eugenol em três diferentes concentrações (µg/mL) e analisados nos momentos 6, 10, 24 e 30 horas. CN: controle negativo; CP: controle positivo (doxorrubicina - Rubidox 1 mg/mL). Os resultados são expressos como média e erro padrão de três experimentos independentes. *p < 0,05 em relação ao controle negativo

4.3 Potencial antigenotóxico do citral

Os resultados referentes ao efeito protetor do citral sobre os danos genotóxicos induzidos pela DOX estão apresentados na Figura 15 e na Tabela 3 (anexa). Nos protocolos de pré e pós-tratamento, a maior concentração (100 µg/mL) do citral foi capaz de reduzir significativamente os níveis de danos no DNA em todos os momentos da avaliação (12, 24 e 36h). Além disso, nesses mesmos protocolos, a concentração intermediária (50 µg/mL) apresentou efeito redutor nos dois primeiros momentos da análise (12 e 24 horas). No pré-tratamento a menor concentração (25 µg/mL) reduziu os danos no DNA apenas no momento 24 horas; no pós-tratamento, esta concentração apresentou efeito protetor quando os níveis de danos no DNA foram analisados após 12 e 36 horas. Para o protocolo de tratamento simultâneo com citral e DOX, a menor concentração de citral (25 µg/mL) foi capaz de reduzir os danos no DNA em todos os momentos de análise, enquanto para as concentrações de 50 e 100 µg/mL, este efeito foi observado apenas no primeiro (12h) e no último momento (36h), respectivamente.

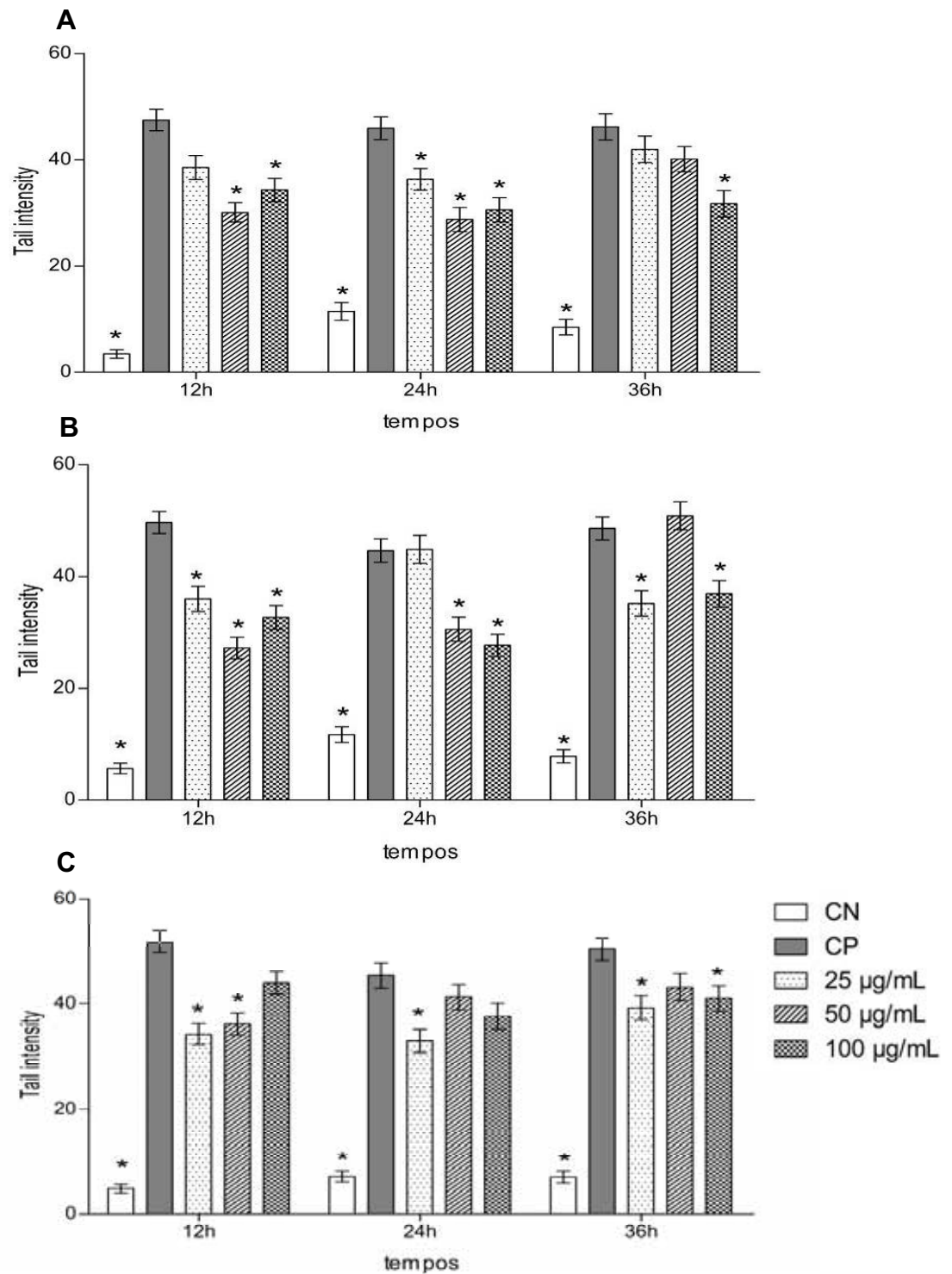


Figura 15 - Danos no DNA (*tail intensity*) em macrófagos peritoneais de camundongo tratados *in vitro* com o citral e com a doxorubicina (DOX - 34 µg/mL). (A) Citral antes da DOX (pré-tratamento); (B) citral após a DOX (pós-tratamento); (C) tratamento simultâneo com o citral e a DOX. CN: controle negativo, CP: controle positivo (DOX). As células foram analisadas nos momentos 12, 24 e 36. Os resultados são expressos como média e erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle positivo.

4.4 Potencial antigenotóxico do eugenol

Os resultados da avaliação do potencial antigenotóxico do eugenol estão apresentados na Figura 16 e na Tabela 4 (anexa). No protocolo de pré tratamento, as duas concentrações intermediárias (0,62 e 1,24 µg/mL) reduziram os danos no DNA em todos os momentos avaliados. Nos dois momentos posteriores ao tratamento (24 e 36 horas), a menor concentração (0,31 µg/mL) também apresentou atividade antigenotóxica. Para o pós tratamento, a concentração de 1,24 µg/mL apresentou potencial redutor de danos nos momentos de 12 e 24 horas. Além disso, a concentração de 0,31 µg/mL apresentou potencial redutor nos tempos 24 e 36 horas. No tratamento simultâneo, os resultados demonstraram que as concentrações 0,62 e 1,24 µg/mL reduziram o potencial genotóxico da DOX logo após o tratamento (t=12h) e no momento 24 horas. A concentração 2,48 µg/mL reduziu os níveis de danos apenas nos momentos 12 e 36 horas. Além disso, nos dois momentos posteriores ao tratamento (24 e 36 horas), a menor concentração 0,31 µg/mL apresentou efeito antigenotóxico.

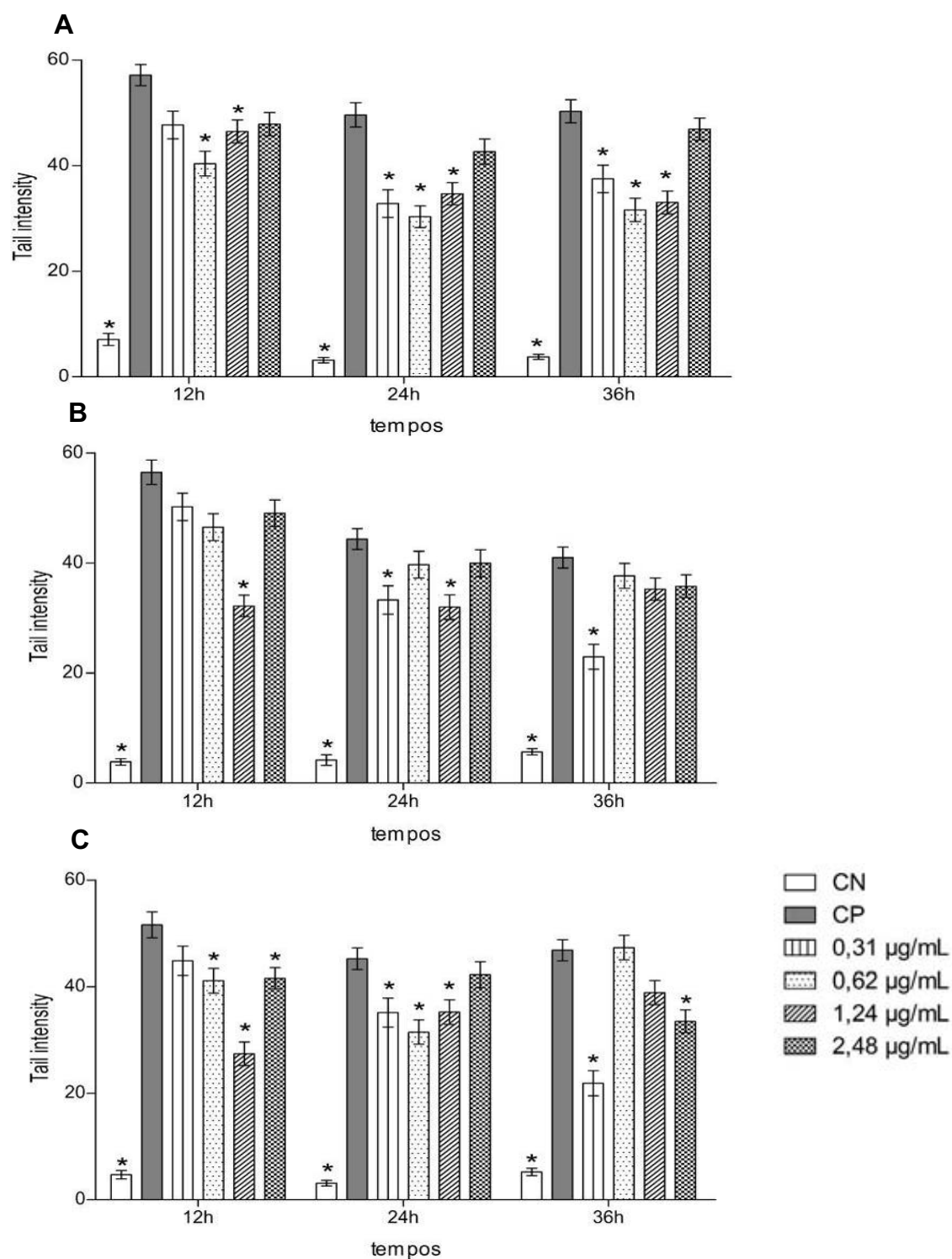


Figura 16 - Danos no DNA (*tail intensity*) em macrófagos peritoneais de camundongo tratados *in vitro* com o eugenol e com a doxorrubicina (DOX - 3,4 µg/mL). A) Eugenol antes da DOX (pré-tratamento); (B) eugenol após a DOX (pós-tratamento); (C) tratamento simultâneo com o eugenol e a DOX. CN: controle negativo; CP: controle positivo. As células foram analisadas nos momentos 12, 24 e 36 horas. Os resultados são expressos como média e erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle positivo.

4.5 Expressão dos genes *COX-2*, *NF-kB1* e *TNF-α* após tratamento com citral e eugenol

Inicialmente, foi avaliado o perfil de expressão dos genes *COX-2*, *NF-kB1* e *TNF-α* após a exposição dos macrófagos peritoneais de camundongos ao citral ou ao eugenol, isoladamente. Em seguida, no intuito de avaliar a atividade moduladora desses compostos em um ambiente inflamatório, as células foram submetidas a co-tratamento com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS - 50 µg/mL). O LPS *per se* induziu aumento significativo na expressão dos genes *COX-2* e *TNF-α*.

Os resultados para os tratamentos com o citral estão apresentados na Figura 17. Para todos os genes esse composto não alterou o padrão de expressão em relação ao controle negativo. Contudo, quando houve a indução do estado inflamatório, o tratamento com a maior concentração de citral (100 µg/mL) reduziu a expressão do gene *COX-2*. Para o *NF-kB1*, nenhum dos tratamentos alterou seu perfil de expressão; para o *TNF-α*, as concentrações de 50 e 100 µg/mL de citral reduziram sua expressão em relação ao tratamento com o LPS.

Com relação ao eugenol, o perfil de expressão dos genes *COX-2*, *NF-kB1* e *TNF-α* estão apresentados na Figura 18. O tratamento com o composto isolado, nas diferentes concentrações, não alterou o perfil de expressão dos genes em relação ao controle negativo. Para o tratamento simultâneo com o LPS, somente a maior concentração de eugenol (2,48 µg/mL) foi capaz de reduzir a expressão do *TNF-α*. Para os outros genes (*COX-2*, *NF-kB1*), não houve modulação estatisticamente significativa.

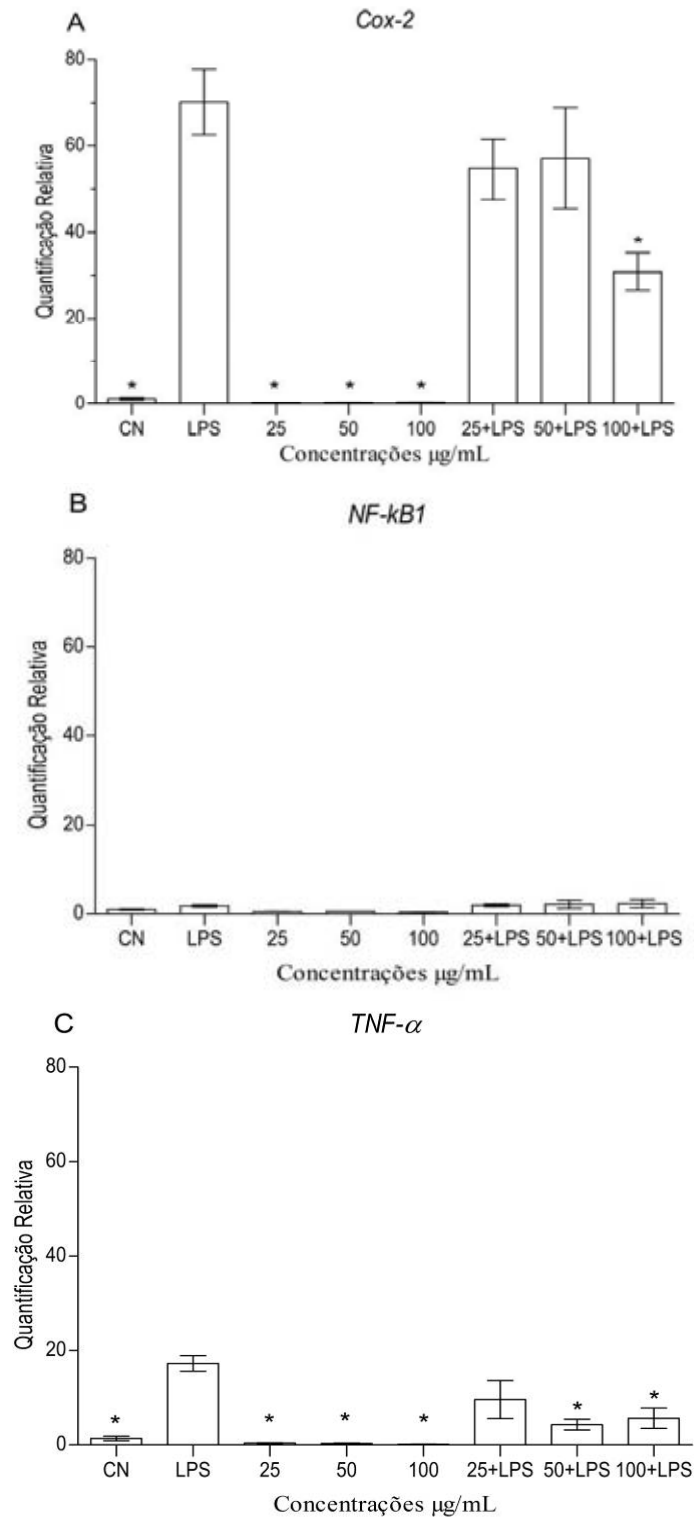


Figura 17 - Quantificação relativa do gene *COX-2* (A), *NF-kB1* (B) e *TNF-α* (C) em macrófagos peritoneais expostos a diferentes concentrações de citral (µg/mL) isoladamente, ou em tratamento simultâneo com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS-50 µg/mL). CN = controle negativo. Os resultados estão expressos em média e erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao LPS.

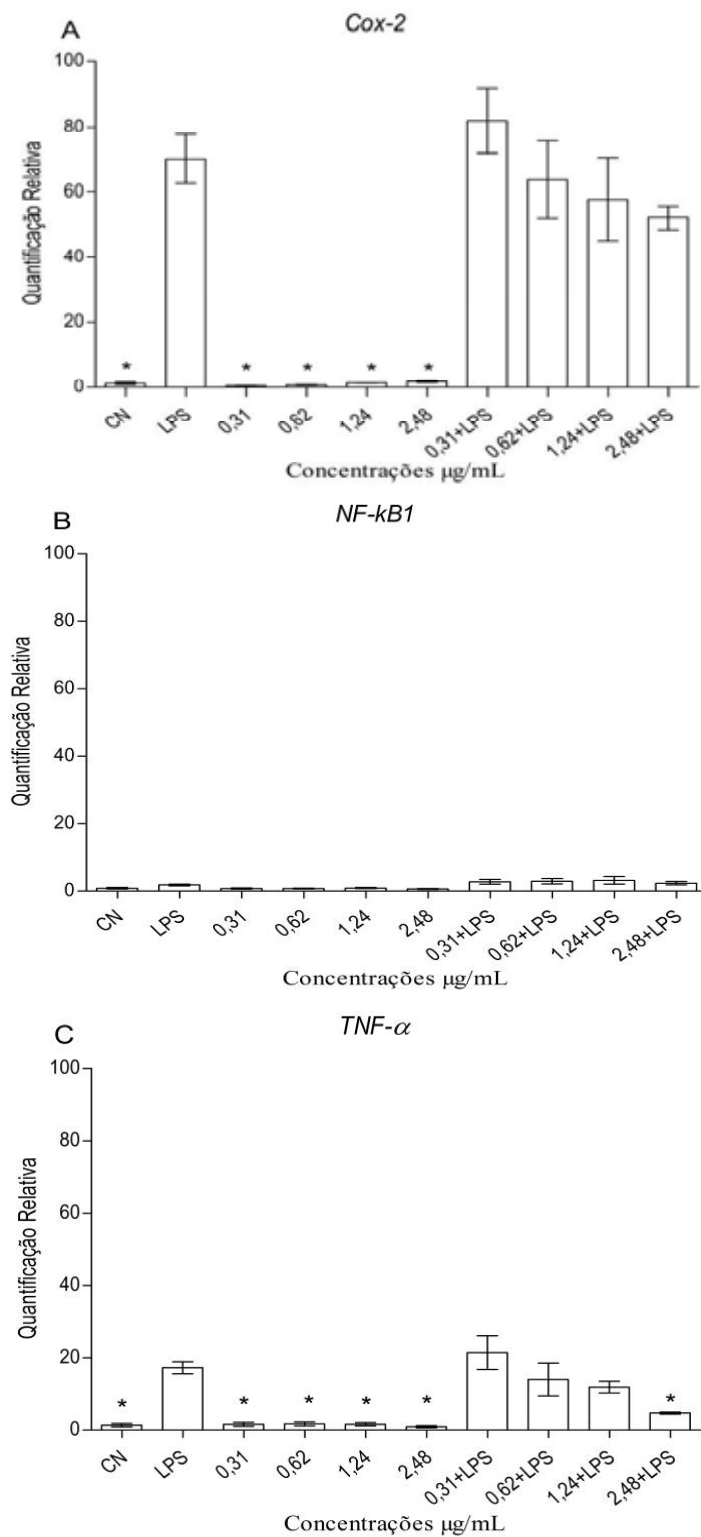


Figura 18 - Quantificação relativa do gene *COX-2* (A), *NF-kB1* (B) e *TNF-α* (C) em macrófagos peritoneais expostos a diferentes concentrações de eugenol (µg/mL) isoladamente, ou em tratamento simultâneo com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS- 50 µg/mL). CN = controle negativo. Os resultados estão expressos em média e erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao LPS.

DISCUSSÃO

A utilização de produtos naturais biologicamente ativos tem popularidade crescente dia após dia sobre a medicina tradicional, se tornando uma abordagem alternativa para o tratamento de várias doenças. No entanto, as evidências científicas sobre a eficácia desses derivados naturais são limitadas e muito pouco se conhece sobre seus mecanismos de ação, o que tem contribuído para retardar sua incorporação na medicina tradicional (MAHAPATRA *et al.*, 2011). Portanto, se faz premente e importante entender não apenas a eficiência e mecanismos de ação dos produtos naturais (MEHTA *et al.*, 2010), mas, também, conhecer seus possíveis efeitos tóxicos. Nesse sentido, os ensaios de genotoxicidade são fundamentais, uma vez que existe estreita relação entre mutações induzidas por fatores endógenos e exógenos e diversas doenças. Assim sendo, o presente estudo foi delineado para avaliar a capacidade do citral e do eugenol presentes, respectivamente, no capim cidrão e no cravo-da-Índia, em induzir ou modular alterações toxicogenômicas em macrófagos peritoneais de camundongos. Ou seja, foram avaliados o potencial genotóxico e antigenotóxico desses dois compostos e a capacidade de modulação da expressão dos genes *COX-2*, *NF-kB1* e *TNF- α* , em condições normais e em estado de inflamatório induzido.

No geral, nossos dados demonstraram que o citral apresentou potencial genotóxico e ao mesmo tempo foi capaz de reduzir os danos no DNA induzidos pela DOX. Quando analisado logo após o tratamento (6h), o citral apresentou efeito genotóxico nas concentrações mais altas, mas as lesões desapareceram após outras 4 horas (análise no momento 10 horas), indicando uma possível ação do sistema de reparo do DNA. Por outro lado, quando utilizado antes e após o tratamento com a DOX, também nas duas concentrações mais altas (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), o citral apresentou efeito protetor contra os danos induzidos pela genotoxina. A menor concentração do citral, por sua vez, mostrou atividade moduladora da genotoxicidade quando administrada simultaneamente à DOX em todos os momentos avaliados.

Recentemente, LÓPEZ *et al.* (2011) demonstraram, pelo SOS cromoteste em *Escherichia coli*, que o citral não exerce atividade genotóxica. Também utilizando bactérias como sistema-teste, GOMES-CARNEIRO *et al.* (1998) relataram que o citral não apresenta atividade mutagênica pelo teste de Ames. Da mesma forma,

não foi observado aumento da frequência de micronúcleo em células do sangue periférico e medula óssea de camundongos (RABBANI *et al.*, 2005). Até onde conhecemos, esses foram os únicos estudos que avaliaram o potencial mutagênico do citral. Contudo, vale ressaltar que esses achados nos remetem a testes para a detecção de mutações, diferentemente do teste do cometa que é capaz de detectar lesões no DNA que são ainda passíveis de correção (GONTIJO & TICE, 2003). De fato, as lesões genotóxicas induzidas pelo citral no presente estudo foram observadas apenas no tempo 6h e desapareceram na análise seguinte (10h), possivelmente como resultado da ação do sistema de reparo do DNA existente nas células.

Com relação à atividade antigenotóxica, existe na literatura grande número de estudos que utilizaram o citral. Esse maior interesse provavelmente se deve ao fato do citral ser um monoterpeno e por haver fortes evidências da capacidade quimioprotetora desses compostos (LOPEZ *et al.* 2011; MITIĆ-CULAFIĆ *et al.* 2009; Crowell, 1999). Por exemplo, assim como em nosso estudo, a canfora, o eucaliptol e a turjona, compostos que apresentam características químicas semelhantes ao citral, também exerceram atividade antigenotóxica contra danos induzidos pelo 4-nitroquinolina 1-óxido em linhagens celulares de rim de macaco (células Vero), mas foram genotóxicos quando utilizados em altas concentrações (NIKOLIĆ *et al.*, 2011). Anteriormente, MITIĆ-CULAFIĆ *et al.* (2009) já haviam demonstrado que o eucaliptol, o mirceno e o linalol, também compostos monoterpênicos, apresentavam efeito protetor contra danos quimicamente induzidos no DNA, sendo essa ação dependente do protocolo de tratamento e concentrações utilizadas. Segundo os autores, os mecanismos de antigenotoxicidade desses compostos podem ser atribuídos à capacidade de captura de radicais livres quando o composto-teste é utilizado simultaneamente ao agente genotóxico. No pré-tratamento, o mecanismo de proteção poderia estar associado à atividade direta dos monoterpenos na captura de radicais livres e à indução de enzimas de detoxificação de fase II. No caso exclusivo do citral, há poucos dados demonstrando seu efeito protetor contra lesões no DNA. LOPEZ *et al.* (2011) relataram que quando esse composto é utilizado simultaneamente à bleomicina, há redução dos danos primários induzidos por esse mutágeno em *Escherichia coli*. Em outros estudos, o citral apresentou atividade antimutagênica reduzindo o número de alterações cromossômicas e

micronúcleos em células da medula óssea e sangue periférico de camundongos (RABBANI *et al.*, 2005). Os mesmos autores demonstraram um ano mais tarde que o citral impedia o processo oxidativo envolvido na formação de radicais livres, levando a um decréscimo na frequência de micronúcleos em eritrócitos expostos ao cloreto de níquel (RABBANI *et al.*, 2006). Levando em consideração, portanto, relatos da atividade antioxidante do citral (RABBANI *et al.*, 2006), e que macrófagos peritoneais são capazes de exercer atividade detoxificadora devido a presença de três isoformas da UDP- glicoronosiltransferases (UGT - importante enzima de metabolização de fase II) (TOCHIGI *et al.*, 2005), podemos sugerir que a atividade antigenotóxica do citral observada em nosso estudo teria ocorrido, em parte, pela inibição da formação de radicais livres gerados pela DOX e pela indução de enzimas de metabolização de fase II.

Com relação ao eugenol, outro composto avaliado neste estudo, foi observado que este é capaz de induzir danos no DNA e que esses danos persistem até 24h após o tratamento. Esses resultados estão de acordo com relatos prévios que também mostraram o efeito genotóxico do eugenol. MARALHAS *et al.* (2006) descreveram que esse composto é capaz de induzir aberrações cromossômicas em células de hamster chinês (V79) na presença ou ausência da fração metabolizadora S9. Segundo MUNERATO *et al.* (2005), o eugenol é uma genotoxina indireta, pois sua atividade genotóxica e recombinogênica é dependente da atividade do citocromo P450. SLAMENOVÁ *et al.* (2009) também relacionaram a atividade genotóxica do eugenol com o espectro de enzimas de biotransformação, em células HepG2 (de hepatoblastoma humano), VH10 (fibroblasto humano) e Caco-2 (de carcinoma de cólon) expostas durante 24 horas a diferentes concentrações de eugenol (50 a 600 µM). Esses autores, utilizando o teste do cometa, detectaram forte efeito genotóxico nas células VH10 (não proficientes em enzimas de metabolismo); efeito moderado em células Caco-2 (que possuem parte das enzimas de fase I e II); e ausência de efeito genotóxico em células HepG2, que possuem sistemas enzimáticos de ativação/detoxificação. Recentemente, MARTINS *et al.* (2010) avaliaram o potencial genotóxico do eugenol (concentrações de 100 a 500 µM) em duas linhagens celulares de ovário de hamster chinês, a AA8 e a EM9, esta última deficiente para o sistema de reparo de DNA (*XRCC1*). Esse estudo, que utilizou os ensaios do cometa e de fosforilação da histona γ H2AX, mostrou

que após uma hora de incubação com o composto houve aumento de quebras de fitas simples e duplas de DNA nas células AA8, mas não nas células EM9. Com base nesses achados, os autores concluem que, ao contrário das células AA8, a linhagem EM9 foi resistente aos efeitos genotóxicos induzidos por agente oxidativo, e sugerem que o potencial a genotóxico do eugenol seria, em parte, devido a lesões oxidativas e quebras de fitas simples originadas pelo mecanismo de reparo por excisão de base do DNA.

De acordo com GERMOLEC *et al.* (1995), os macrófagos possuem enzimas de detoxificação como o citocromo P450 1A1 (CYP1A1). Contudo, a presença dessas enzimas está associada ao estado de maturação dos macrófagos. Em monócitos relativamente imaturos, como aqueles da cavidade peritoneal ou do sangue periférico, há pouca ou nenhuma presença de CYP1A1, enquanto macrófagos teciduais, mais maduros, como a célula de Kupffer, apresentam níveis elevados dessa enzima. Mais recentemente, TOCHIGI *et al.* (2005) relataram a presença de três isoformas da enzima de metabolização de fase II (UDP-glicoronosiltransferases) em macrófagos peritoneais. Portanto, nossos resultados, além de confirmar o potencial genotóxico do eugenol, concordam com os achados de SLAMENOVÁ *et al.* (2009), evidenciando a atividade genotóxica moderada do eugenol em macrófagos peritoneais, uma vez que essas células possuem parte das enzimas de metabolização.

Sabe-se que muitos compostos químicos que apresentam atividades mutagênicas e carcinogênicas, dependendo das condições experimentais, como do tipo celular ou protocolos de tratamento, podem também exercer atividades antimutagênicas e anticarcinogênicas (VON BORSTEL & HIGGINS, 1998). Nesse contexto, apesar do eugenol ter apresentado potencial genotóxico em avaliações anteriores, no presente estudo investigamos sua capacidade em também atuar como substância moduladora de danos quimicamente induzidos no DNA. De fato, o eugenol exerceu atividade antigenotóxica em todos os protocolos de tratamento. No entanto, quando utilizado anteriormente à DOX, foi observado que em todos os momentos avaliados maior número de concentrações foi capaz de reduzir os danos no DNA. Esses achados permitem sugerir que a atividade antigenotóxica do eugenol poderia estar relacionada à indução prévia de enzimas de biotransformação e à

atividade de captura de espécies reativas de oxigênio. De fato, relatos na literatura sustentam essa hipótese, uma vez que o eugenol induz aumento dos níveis de enzimas de biotransformação de fase II (glutathione-S-transferase e glicosiltransferase) (ROMPELBERG *et al.*, 1993; KUMARAVELU *et al.*, 1995; ROMPELBERG *et al.*, 1996). Em macrófagos peritoneais de camundongos, a suplementação com o composto foi também capaz de aumentar o *status* antioxidante dessas células (MAHAPATRA *et al.*, 2009a).

Nossos resultados corroboram achados anteriores relatados por YOGALAKSHMI *et al.* (2010), que demonstram que o eugenol reduz os danos induzidos pela tioacetamida em sangue periférico de ratos tratados com de eugenol (10,7 mg/kg). MAHAPATRA *et al.* (2009a), também utilizando macrófagos peritoneais de camundongo mostraram que o tratamento *in vitro* com o eugenol (15 µg/mL) reduz os níveis de fragmentação do DNA induzidos pela nicotina. Previamente, os mesmos autores (MAHAPATRA *et al.*; 2009b) haviam destacado a importância de estudos em macrófagos peritoneais de camundongo, por serem essas células representativas de outras populações de macrófagos, e o peritônio por ser local de fácil acesso e onde os macrófagos estão disponíveis em quantidades superiores aos fagócitos do sangue (monócitos ou neutrófilo).

Efeito antimutagênico do eugenol *in vivo* havia sido relatado por ABRAHAN (2001), quando camundongos tratados com o composto fenólico apresentaram redução da frequência de micronúcleos induzidos pela ciclofosfamida, pela procarbazona e pela metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina. Por outro lado, SLAMENOVÁ *et al.* (2009) relataram que em células HepG2 a pré-incubação com eugenol (50 a 600 µM) não protegeu o DNA contra danos causados pelo peróxido de hidrogênio, e que, pelo contrário, as concentrações de 200 e 400 µM e de 100, 150, 450 e 600 µM promoveram aumento de danos do DNA, respectivamente na linhagem Caco-2 e VH10.

Essa dupla ação do eugenol pode estar relacionada ao fato de que alguns compostos fenólicos, dependendo das concentrações utilizadas e condições do meio (pH e solubilidade), podem atuar como agentes pró- e antioxidantes. ATSUMI *et al.* (2001) observaram que o eugenol *per se* não foi capaz de aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio em fibroblastos de gengiva (células HGF) e em células

de adenocarcinoma submandibular humano (HSG). No entanto, quando essas mesmas células foram irradiadas com luz visível e submetidas a pH alcalino, houve aumento na geração de radicais livres. Em células HSG submetidas a estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio ou pela radiação com luz visível, o eugenol comportou-se como agente pró-oxidante em baixas concentrações (5-10 μ M) e antioxidante em altas concentrações (500 μ M) (ATSUMI *et al.*, 2005).

Além dos efeitos do citral e do eugenol sobre a estrutura do DNA, avaliamos, também, a possível interferência desses compostos sobre a expressão dos genes *COX-2*, *NF-kB1* e *TNF- α* . Atualmente, é bastante ressaltado que embora uma substância não seja mutagênica ela pode apresentar efeito toxicogenômico (sobre a expressão gênica), e que este seria igualmente prejudicial à célula ou ao organismo (ELLINGER-ZIEGELBAUER *et al.*, 2009). Por outro lado, a modulação do padrão de expressão gênica pode ser o mecanismo pelo qual determinado agente exerce sua atividade quimioprotera, como por exemplo, atividade antioxidante e anti-inflamatória, inibição da proliferação celular, indução da diferenciação celular e apoptose (DE FLORA & FERGUSON, 2005). Nosso estudo demonstrou, no entanto, que nem o citral e nem o eugenol interferiram no padrão de expressão desses genes. Considerando que os genes *COX-2*, *NF-kB1* e *TNF- α* estão relacionados a processos inflamatórios, decidimos avaliar o efeito toxicogenômico do citral e do eugenol após o tratamento das células com o LPS. O LPS é um componente presente na membrana de bactérias gram negativas e um potente ativador de macrófagos, levando a indução da expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o *TNF- α* , interferon- β (IFN- β), iNOS e *COX-2* (PALSSON-MCDERMOTT & O'NEILL, 2004; BLATTEIS *et al.*, 2005). De fato, observamos que a exposição ao LPS aumentou a expressão dos genes *COX-2* e *TNF- α* , mas não do gene *NF-kB1*, em macrófagos peritoneais de camundongos. Portanto, a ausência de indução do *NF-kB1* pelo LPS não nos permitiu avaliar o efeito do citral e do eugenol sobre esse gene em macrófagos ativados. Recentemente, KAPRAL *et al.* (2010) também não encontraram alterações significativas na expressão do gene *NF-kB1* após o tratamento de células Caco-2 com o LPS, embora tenham observado que outros membros da família NF-kB, como o p65, tivessem sido modulados.

Com relação à *COX-2*, nossos resultados demonstraram que a maior

concentração de citral (100 µg/mL) reduziu a expressão do gene em relação ao tratamento apenas com o LPS. A ciclooxigenase 2 (COX-2) é uma enzima chave na síntese de prostaglandinas e, em condições de metabolismo normal, é expressa em pequenas quantidades, sendo induzida por citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e por microorganismos e seus produtos, como por exemplo o LPS (CHAOUKI *et al.*, 2009; KATSUKAWA *et al.*, 2010). A expressão descontrolada e prolongada da COX-2 pode causar resposta inflamatória excessiva, resultando em danos teciduais e crescimento de tumores (WU *et al.*, 2005). Recentemente, KATSUKAWA *et al.* (2010) relataram que o citral possui atividade anti-inflamatória por reprimir tanto a expressão relativa do RNAm como a proteína COX-2 em linhagens de macrófagos humanos induzidos por lipopolisacarídeo. Levando em consideração a semelhança na estrutura química, outros compostos monoterpênicos, como o citronelol e o geraniol, também inibiram a indução da expressão da proteína e do mRNA da COX-2 em de macrófagos murinos RAW 264.7 induzidos pelo LPS (SU *et al.*, 2010). Contudo, diferentemente, LIN *et al.* (2008) observaram que o citral não foi capaz de reduzir a expressão da proteína COX-2 em RAW 264.7 estimulados com LPS. Apesar disso, esses mesmos autores afirmam que o citral possui atividade anti-inflamatória por inibir a produção de óxido nítrico e a proteína óxido nítrico sintetase (iNOS) *in vitro* e inibir o edema de orelha *in vivo*.

Outro importante mediador molecular da resposta inflamatória, o TNF- α possui a capacidade de induzir a produção de diversas citocinas (como a IL-1 β e a IL-6), quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas que têm como função geral ativar a imunidade inata. Em células e tecidos altas concentrações de TNF- α podem induzir apoptose, enquanto baixas concentrações podem promover a proliferação celular e o reparo do tecido após lesões (EGAN, 2004). No presente estudo, o citral, nas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL), reduziu a expressão relativa de TNF- α em relação ao tratamento apenas com o LPS. Esse achado é de grande relevância, pois reforça o TNF- α como importante alvo para a prevenção de eventos inflamatórios induzidos por compostos químicos. Apesar de poucos dados na literatura referentes à influência de compostos monoterpênicos na modulação da expressão do TNF- α , LIN *et al.* (2008) relataram que o citral inibe o aumento dos níveis de TNF- α em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.

Recentemente, TIWARI *et al.* (2010) demonstraram que o extrato alcoólico do capim cidrão, que possui o citral como composto majoritário, reduziu a geração do $TNF-\alpha$ em macrófagos broncoalveolares estimulados com LPS. Portanto, nossos achados reforçam o potencial anti-inflamatório do citral e demonstram que a modulação dos genes *COX-2* e *TNF- α* pode ser um dos mecanismos envolvidos em tal atividade.

Para o eugenol, nossos resultados mostraram ausência de efeito significativo sobre a expressão do gene *COX-2*, quando comparado àquele do LPS. Diferentemente, KIM *et al.* (2003) relataram que o eugenol, de modo concentração-dependente (2,0 – 50 μ M), reduziu os níveis de mRNA do *COX-2* em macrófagos RAW264.7 estimulados com o LPS. Somado a isso, LEE *et al.* (2007) observaram que em macrófagos humanos U937 submetidos a condições inflamatórias o eugenol a 1 mmol/L também reduziu a expressão do gene *COX-2*. As diferenças entre os resultados poderiam ser explicadas pelo grau de maturação e diferenciação dos macrófagos, uma vez que nosso estudo foram utilizadas culturas primárias. Com relação ao *TNF- α* , detectamos que o eugenol reduziu a expressão relativa do gene após o tratamento com o LPS. Em estudo recente, foi demonstrado que macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com nicotina apresentavam maior expressão do *TNF- α* , e que o tratamento com o eugenol era também capaz de reduzir a expressão do gene (MAHAPATRA *et al.*, 2011). De maneira similar, LEE *et al.* (2007) haviam previamente reportado que o eugenol foi capaz de reduzir a expressão do *TNF- α* em macrófagos humanos sob estímulo inflamatório. Da mesma forma que para o citral, nossos achados reforçam a característica anti-inflamatória do eugenol, e sugerem como um dos possíveis mecanismos a redução da expressão do gene *TNF- α* .

Concluindo, os resultados do presente estudo indicaram que o citral e o eugenol podem atuar como agentes quimioprotetores contra danos no DNA induzidos pela DOX (genotoxina com capacidade de induzir estresse oxidativo) em macrófagos peritoneais ativos de camundongo, e como agentes anti-inflamatórios, atuando na modulação da expressão dos genes *COX-2* e *TNF- α* . No entanto, a utilização desses compostos em estratégias preventivas e terapêuticas deve ser vista ainda com cautela, uma vez que tanto o citral como o eugenol demonstraram habilidade para induzir alterações na molécula de DNA.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo, que utilizou macrófagos peritoneais de camundongos, *in vitro*, permitem as seguintes conclusões:

- o citral apresenta fraco potencial genotóxico (as lesões induzidas no DNA desaparecem 4 horas após o final da exposição), que depende das concentrações utilizadas;
- o citral apresenta efeito protetor contra danos no DNA induzidos pela doxorubicina (DOX), independente do protocolo de tratamento empregado, sendo mais eficiente quando utilizado simultaneamente à genotoxina;
- o eugenol (nas concentrações de 0,62, 1,24 e 2,48 µg/mL) apresenta efeito genotóxico, que persiste por pelo menos 24 horas após o tratamento;
- o eugenol apresenta efeito antígeno-tóxico contra os danos induzidos pela DOX, especialmente quando utilizado anteriormente à genotoxina;
- o citral e o eugenol *per se* não alteraram a expressão dos genes COX-2 e *TNF-α* em macrófagos peritoneais de camundongo;
- o citral e o eugenol reduziram a expressão, respectivamente, dos genes COX-2 e *TNF-α* e apenas *TNF-α*, em macrófagos peritoneais de camundongo ativados pelo LPS.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHHAB, M. A.; ALY, S. E. Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. **J. Appl. Toxicol.**, v. 25, p. 218-223, 2005.

ABRAHAM, S. K. Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 493-498, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA 2011. Disponível em: <[http:// portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/medicamentos/](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/medicamentos/)> acessado em: 22 de agosto de 2011.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem. Pharmacol.**, v.71, p. 1397-1421, 2006.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 7915-7922, 1993.

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

ARORA, R.; MALHOTRA, P.; CHAWLA, R.; GUPTA, D.; JUNEJA, M.; KUMAR, R.; SHARMA, A.; BALIGA, M. S.; SHARMA, P. K.; TRIPATHI, R. P. Herbal drugs for oncology: current status and future directions in cancer chemioprevention. In: ARORA, R. **Herbal medicine a cancer chemiopreventive and therapeutic perspective**. Jaypee Brothers Medical Publishers, 2010. p. 2-41.

ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. **Toxicol. In Vitro.**, v. 19, p. 1025-1033, 2005.

ATSUMI, T.; IWAKURA, I.; FUJISAWA, S.; UEHA, T. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. **Biomaterials.**, v. 22, p.1459-1466, 2001.

BAER, M.; DILLNER, A.; SCHWARTZ, R. C.; SEDON, C.; NEDOSPASOV, S.; JOHNSON, P. F. Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF-kappaB p50. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, p. 5678-5689, 1998.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 9, p. 361-371, 2009.

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

BANERJEE, S.; PANDA, C. K.; DAS, S. Clove (*Syzygium aromaticum* L.), a potential chemopreventive agent for lung cancer. **Carcinogenesis.**, v. 27, p. 1645-1654, 2006.

BARBOSA, L. C.; PEREIRA, U. A.; MARTINAZZO, A. P.; MALTHA, C. R.; TEIXEIRA, R. R.; MELO, C. E. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) stapf samples. **Molecules.**, v. 13, p.1864-1874, 2008.

BHATNAGAR, S.; PANGULURI, S.K.; GUPTA, S.K.; DAHIYA, S.; LUNDY, R.F.; KUMAR, A. Tumor necrosis factor- α regulates distinct molecular pathways and gene networks in cultured skeletal muscle cells. **PLoS. One.**, v. 5, p. e13262, 2010.

BIDINOTTO, L. T.; COSTA, C. A.; SALVADORI, D. M.; COSTA, M.; RODRIGUES, M. A.; BARBISAN, L. F. Protective effects of lemongrass (*Cymbopogon citratus* STAPF) essential oil on DNA damage and carcinogenesis in female Balb/C mice. **J. Appl. Toxicol.**, 2010, *In press*.

BINGLE, L.; BROWN, N.J.; LEWIS, C.E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J Pathol.**, v. 196, p. 254-265, 2002.

BLANCO, M. M.; COSTA, C. A.; FREIRE, A. O.; SANTOS, J. G. JUNIOR.; COSTA, M.. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine.**, v.16, p. 265-270, 2009.

BLATTEIS, C.M.; LI, S.; LI, Z.; FELEDER, C.; PERLIK, V. Cytokines, PGE2 and endotoxin fever: a re-assessment. **Prostaglandins Other Lipid. Mediat.**, v. 76, p. 1-18, 2005.

BOHR, V.A. DNA damage and its processing. Relation to human disease. **J. Inherit. Metab. Dis.**, v. 25, p. 215-222, 2002.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 25, p. 169-193, 2000.

CAI, L. & WU, C. D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 987-990, 1996.

CAMPANIELLO, D.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. Antifungal activity of eugenol against *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species. **J. Food. Prot.**, v. 73, p. 1124-1128, 2010.

CAO, S.; ZHANG, X.; EDWARDS, J. P.; MOSSER, D. M. NF- κ B1 (p50) Homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 26041–26050, 2006.

CARDOSO, J.; SOARES, M. J. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**, v. 105, p.1026-1032, 2010.

CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. P.; SILVA-FILHO, A. R.; DA SILVEIRA-FILHO. N. G.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BUENO, O. F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 17, p.37-64, 1986.

CHAOUKI, W.; LEGER, D. Y.; LIAGRE, B.; BENEYTOUT, J. L.; HMAMOUCI, M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 23, p.549-556, 2009.

CIANCHI, F.; CORTESINI, C.; BECHI, P.; FANTAPPIÈ, O.; MESSERINI, L.; VANNACCI, A.; SARDI, I.; BARONI, G.; BODDI, V.; MAZZANTI, R.; MASINI, E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 121, p.1339-1347, 2001.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Mol. Cell.**, v. 40, p. 179-204, 2010.

CLARKE, C.H.; SHANKEL, D.M. Antimutagenesis in microbial systems. **Bacteriol Rev.**, v. 39, p. 33-53, 1975.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol. Biotechnol.**, v. 26, p. 249-261, 2004.

CROWELL PL. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J. Nutr.**, v. 129, p. 775S-778S, 1999.

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

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **J. Ethnopharmacol.**, v. 130, p.107-115, 2010.

DORÉ, M. Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. **Vet. Pathol.**, v. 48, p. 254-265, 2011.

DUDAI, N.; WEINSTEIN, Y.; KRUP, M.; RABINSKI, T.; OFIR, R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. **Planta Med.**, v. 71, p. 484-488, 2005.

DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiol. Res.**, v. 59, 459-469, 2010.

EGAN, L.J. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). **Enc. of Gast.**, p.534-537, 2004.

ELLINGER-ZIEGELBAUER, H.; AUBRECHT, J.; KLEINJANS, J. C.; AHR, H. J. Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. **Toxicol. Lett.**, v. 186, p.36-44, 2009.

ELSHARKAWY, A. M.; OAKLEY, F.; LIN, F.; PACKHAM, G.; MANN, D. A.; MANN, J. The NF- κ B p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes. **J. Hepatol.**, v.53, p. 519–527, 2010.

FARROW, B.; EVERS, B. M. Inflammation and the development of pancreatic cancer. **Surg. Oncol.**, v.10, p.153-169, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-FDA, 2001 disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/Alerts/ucm111219.htm>> acessado em: 22 de agosto de 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-FDA, 2002 disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm085482.htm>> acessado em: 22 de agosto de 2011.

FUGH-BERMAN, A. Herb-drug interactions. **Lancet.**, v. 355, p. 134-138, 2000.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology.**, v. 177, p. 39-54, 2002.

GERMOLEC, D.R.; ADAMS, N.H.; LUSTER, M.I. Comparative assessment of metabolic enzyme levels in macrophage populations of the F344 rat. **Biochem. Pharmacol.**, v.50, p.1495-1504, 1995.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, p. 727-741, 1999.

GOLDEN, B. D.; ABRAMSON, S. B. Selective Cyclooxygenase-2 inhibitors. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**, v. 25, p. 359-378, 1999.

GOMES-CARNEIRO, M.R.; FELZENSZWALB, I.; PAUMGARTTEN, F.J. Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. **Mutat Res.**, v. 416, p.129-136, 1998.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editores. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra ; 2003. p. 247-79.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. Mutação, Reparo e Recombinação. In GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.440-469.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Ann. Epidemiol.**, v. 15, p. 686-699, 2005.

HAN, E. H.; HWANG, Y. P.; JEONG, T. C.; LEE, S. S.; SHIN, J. G.; JEONG, H. G. Eugenol inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genotoxicity in MCF-7 cells: bifunctional effects on CYP1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase. **FEBS. Lett.**, v. 581, p.749-756, 2007.

HE, M.; DU, M.; FAN, M.; BIAN, Z. *In vitro* activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia.**, v. 163, p.137-143, 2007.

HENDERSON, L.; WOLFREYS, A.; FEDYK, J.; BOURNER, C.; WINDEBANK, S. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. **Mutagenesis.**, v. 13, p.89-94, 1998.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. **Int. J. Cancer.**, v. 121, p. 2373-2380, 2007.

IRKIN, R.; KORUKLUOGLU, M. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil to inhibit the growth of some filamentous fungi and yeasts. **J. Med. Food.**, v. 12, p. 193-197, 2009.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature.**, v. 461, p. 1071-1078, 2009.

JANSSENS, S.; TSCHOPP, J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF- κ B response. **Cell Death. Differ.**, v.13, p. 773-784, 2006.

JONES, S. B.; DEPRIMO, S. E.; WHITFIELD, M. L.; BROOKS, J. D. Resveratrol-induced gene expression profiles in human prostate cancer cells. **Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.**, v. 14, p. 596-604, 2005.

KAPRAL, M.; WĘGLARZ, L.; PARFINIEWICZ, B.; LODOWSKA, J.; JAWORSKA-KIK, M. Quantitative evaluation of transcriptional activation of NF- κ B p65 and p50 subunits and I κ B α encoding genes in colon cancer cells by *Desulfovibrio desulfuricans* endotoxin. **Folia Microbiol (Praha).**, v.55, p.657-661, 2010.

KATSUKAWA, M.; NAKATA, R.; TAKIZAWA, Y.; HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1801, p. 1214-1220, 2010.

KIM, S.S.; OH, O.J.; MIN, H.Y.; PARK, E.J.; KIM, Y.; PARK, H.J.; NAM HAN, Y.; LEE, S.K. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. **Life Sci.**, v. 6, p. 337- 348, 2003.

KIM, I.D.; HA, B.J. Paeoniflorin protects RAW 264.7 macrophages from LPS-induced cytotoxicity and genotoxicity. **Toxicol. In Vitro.**, v. 23, p. 1014-1019, 2009.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; EICHENLAUB-RITTER, U.; DECORDER, I. Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicol. Lett.**, v. 141, p. 63-74, 2003.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 44, p. 143-161, 2002.

KOKI, A. T.; MASFERRER, J. L. Celecoxib: A Specific COX-2 Inhibitor with anticancer properties. **Cancer Control.**, v. 9, p. 28-35, 2002.

KOSALEC, I.; CVEK, J.; TOMIĆ, S. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. **Arh. Hig. Rada. Toksikol.**, v. 4, p. 485-501, 2009.

KUMAR, A.; TAKADA, Y.; BORIEK, A. M.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kB: its role in health and disease. **J. Mol. Med.**, v. 82, p. 434-448, 2004.

KUMARAVELU, P.; DAKSHINAMOORTHY, D.P.; SUBRAMANIAM, S.; DEVARAJ, H.; DEVARAJ, N.S. Effect of eugenol on drug-metabolizing enzymes of carbon tetrachloride-intoxicated rat liver. **Biochem. Pharmacol.**, v. 49 p. 1703-1707, 1995.

KUNDU J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: Gearing the journey to cancer. **Mutat. Res.**, v. 659, p. 15-30, 2008.

LADEIRA, M. S. P.; RODRIGUES, M. A. M.; SALVADORI, D. M. F.; PADULLA NETO, P.; ACHILLES, P.; LERCO, M. M.; RODRIGUES, P. A.; GONÇALVES, I.; QUEIROZ, D. M. M.; FREIRE-MAIA, D. V. Relationships between cagA, vacA, and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* and DNA damage in the gastric mucosa. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 44, p. 91-98, 2004.

LEE, H. J.; JEONG, H. S.; KIM, D. J.; NOH, Y. H.; YUK, D. Y.; HONG, J. T. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF- κ B activation in RAW264.7 cells. **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, p.342-349, 2008.

LEE, Y. Y.; HUNG, S. L.; SHENG-FANG P.; LEE, Y. H.; YANG, S. F. Eugenol suppressed the expression of lipopolysaccharide-induced proinflammatory mediators in human macrophages. **J. Endod.**, v. 33, p. 698-702, 2007.

LEENDERTSE, M.; WILLEMS, R.J.; GIEBELEN, I.A.; VAN DEN PANGAART, P.S.; BONTEN, M.J.; VAN DER, POLL. T. The acute-phase response impairs host defence against *Enterococcus faecium* peritonitis. **Immunology.**, v. 128, p. e335-e342, 2009.

LIN, C.T.; CHEN, C.J.; LIN, T.Y.; TUNG, J.C.; WANG, S.Y. Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 8783-8787, 2008.

LIN, H. W.; TU, Y. Y.; LIN, S. Y.; SU, W. J.; LIN, W. L.; LIN, W. Z.; WU, S. C.; LAI, Y. L. Risk of ovarian cancer in women with pelvic inflammatory disease: a population-based study. **Lancet. Oncol.**, *in press*, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻DDCT. **Method.**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LÓPEZ, M. A.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genet Mol Biol.**, v.34, p. 479–488, 2011.

LUQMAN, S.; PEZZUTO, J. M. NF κ B: A Promising target for natural products in cancer chemoprevention. **Phytother. Res.**, v. 24, p. 949–963, 2010.

MAGALHÃES, C. B.; RIVA, D. R.; DE PAULA, L. J.; BRANDO-LIMA, A.; KOATZ, V. L.; LEAL-CARDOSO, J. H.; ZIN, W. A.; FAFFE, D. S. In vivo anti-inflammatory action

of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. **J. Appl. Physiol.**, v. 108, p. 845-851, 2010.

MAHAPATRA, S. K.; CHAKRABORTY, S. P.; MAJUMDAR, S.; BAG, B. G.; ROY, S. Eugenol protects nicotine-induced superoxide mediated oxidative damage in murine peritoneal macrophages *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 623, p. 132-140, 2009a.

MAHAPATRA, S. K.; CHAKRABORTY, S. P.; DAS, S.; ROY, S. Methanol extract of *Ocimum gratissimum* protects murine peritoneal macrophages from nicotine toxicity by decreasing free radical generation, lipid and protein damage and enhances antioxidant protection. **Oxid. Med. Cell Longev.**, v. 2, p. 222–230, 2009b.

MAHAPATRA, S. K.; BHATTACHARJEE, S.; CHAKRABORTY, S.P.; MAJUMDAR, S.; ROY, S. Alteration of immune functions and Th1/Th2 cytokine balance in nicotine-induced murine macrophages: immunomodulatory role of eugenol and N-acetylcysteine. **Int. Immunopharmacol.**, v. 11, p. 485-495, 2011.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature.**, v.454, p. 436-444, 2008.

MANZI, S. F.; SHANNON, M. Drug Interactions—A Review. **Clin. Pediatr. Emerg. Med.**, v. 6, p. 93-102, 2005.

MARALHAS, A.; MONTEIRO, A.; MARTINS, C.; KRANENDONK, M.; LAIRES, A.; RUEFF, J.; RODRIGUES, A.S. Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol. **Mutagenesis.**, v. 21, p. 199-204, 2006.

MARTINS, C.; DORAN, C.; LAIRES, A.; RUEFF, J.; RODRIGUES, A. S. Genotoxic and apoptotic activities of the food flavourings myristicin and eugenol in AA8 and XRCC1 deficient EM9 cells. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 49, p. 385-392, 2010.

MEHTA, R. G.; MURILLO, G.; NAITHANI, R.; PENG, X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? **Pharm. Res.**, v. 27, p. 950-961, 2010.

MERCÚRIO, F.; MANNING, A. M. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. **Oncogene**, v. 18, p. 6163-6171, 1999.

MEYDANI, S.N.; WU, D.; SANTOS, M.S.; HAYEK, M.G. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 62, p. 6 1462S-1476S, 1995.

MICHIELSEN, P. P. FRANCQUE S. M.; VAN DONGEN, J. L. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. **World J. Surg. Oncol.**, v. 20, p. 3-27, 2005.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, p. 185-229, 2004.

MITIĆ-CULAFIĆ, D.; ZEGURA, B.; NIKOLIĆ, B.; VUKOVIĆ-GACIĆ, B.; KNEZEVIĆ-VUKCEVIĆ, J.; FILIPIC, M. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 47, p.260-266, 2009.

MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. Antimutagenic activity of phenylpropanoids from clove (*Syzygium aromaticum*). **J. Agric. Food. Chem.**, v. 51, p. 6413-6422, 2003.

MIZGERD, J. P.; LUPA, M. M.; KOGAN, M. S.; WARREN, H. B.; KOBZIK, L.; TOPULOS, G. P. Nuclear factor-kappaB p50 limits inflammation and prevents lung injury during *Escherichia coli* pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v.168, p. 810-817, 2003.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 958-969, 2008.

MÜLLER, L.; KIKUCHI, Y.; PROBST, G.; SCHECHTMAN, L.; SHIMADA, H.; SOFUNI, T.; TWEATS, D. ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. **Mutat. Res.**, v. 436, p.195-225, 1999.

MUNERATO, M.C.; SINIGAGLIA, M.; REGULY, M.L.; DE ANDRADE, H.H. Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, v. 582, p. 87-94, 2005.

NAKAMURA, Y.; MIYAMOTO, M.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. A phase II detoxification enzyme inducer from lemongrass: identification of citral and involvement of electrophilic reaction in the enzyme induction. **Biochem. Bioph. Res. Commun.**, v. 302, p. 593-600, 2003.

NIKOLIĆ, B.; MITIĆ-ĆULAFIĆ, D.; VUKOVIĆ-GAČIĆ, B.; KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. **Food. Chem. Toxicol.**, 49: 2035-2045, 2011

OAKLEY, F.; MANN, J.; NAILARD, S.; SMART, D. E.; MUNGALSINGH, N.; CONSTANDINOU, C.; ALI, S.; WILSON, S.J.; MILLWARD-SADLER, H.; IREDALE, J. P.; MANN, D. A. Nuclear factor-kappaB1 (p50) limits the inflammatory and fibrogenic responses to chronic injury. **Am. J. Pathol.**, v. 166, p. 695-708, 2005.

OBACH, R.S. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 294, p. 88-95, 2000.

OBEREMM, A.; ONYON, L.; GUNDERT-REMY, U. How can toxicogenomics inform risk assessment? **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 207, p. 592-598, 2005.

PÅLSSON-MCDERMOTT, E. M. & O'NEILL, L. A. J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology.**, v. 113, p. 153–162, 2004.

PANA, M. H; HO, C. T. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. **Chem. Soc. Rev.**, v. 37, p. 2558-2574, 2008.

POPA, C.; NETEA, M.G.; VAN RIEL, P.L.C.M.; VAN DER MEER, J.W.M.; STALENHOEF, A.F.H. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **J. Lipid. Res.**, v. 48, p. 751-762, 2007.

PUATANACHOKCHAI, R.; KISHIDA, H.; DENDA, A.; MURATA, N.; KONISHI, Y.; VINITKETKUMNUEN, U.; NAKAE, D. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer Lett.**, v. 183, p. 9-15, 2002.

RABBANI, S. I.; DEVI, K.; KHANAM, S.; ZAHRA, N. Citral, a component of lemongrass oil inhibits the clastogenic effect of nickel chloride in mouse micronucleus test system. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 19, p.108-113, 2006.

RABBANI, S. I.; DEVI, K.; ZAHRA, N. Anti-clastogenic effects of citral. **Iranian J. Pharmacol. Ther.**, v. 4, p. 28-31, 2005.

RAHMAN, I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 36, p. 95-109, 2003.

RAO, B. S.; SHANBHOGE, R.; RAO, B. N.; ADIGA, S. K.; UPADHYA, D.; AITHAL, B. K.; KUMAR, M. R. Preventive efficacy of hydroalcoholic extract of *Cymbopogon citratus* against radiation-induced DNA damage on V79 cells and free radical scavenging ability against radicals generated *in vitro*. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 28, p. 195-202, 2009.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon.**, v. 39, p. 603–613, 2001.

RODRIGUES, T. G.; FERNANDES JUNIOR, A.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. *In vitro* and *in vivo* effects of clove on pro-inflammatory cytokines production by macrophages. **Nat. Prod. Res.**, v. 23, p. 319-326, 2009.

ROMPELBERG, C.J.; VERHAGEN, H.; VAN BLADEREN, P.J. Effects of the naturally occurring alkenylbenzenes eugenol and trans-anethole on drug-metabolizing enzymes in the rat liver. **Food Chem. Toxicol.**, v.31, p. 637-645, 1993.

ROMPELBERG, C. J.; EVERTZ, S. J.; BRUIJNTJES-ROZIER, G. C.; VAN DEN HEUVEL, P. D.; VERHAGEN, H. Effect of eugenol on the genotoxicity of established mutagens in the liver. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 34, p. 33-42, 1996.

RUSSELL, R. I. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal damage-problems and solutions. **Postgrad. Med.**, J. v. 77, p. 82-88, 2001.

SADDIQ, A.A.; KHAYYAT, S.A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochem. Physiol.**, v. 98, p. 89-93, 2010.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia.**, v. 81, p. 462-471, 2010.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M. F.; GRACE, S. C.; YAMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology.**, v. 177, p. 67-80, 2002.

SANTIN, M. R.; DOS SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; FERREIRA, I. C.; UEDA-NAKAMURA, T. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitol. Res.**, v. 105, p.1489-1496, 2009.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G.; FREIRE, J. M.; SOARES, M. J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology.**, v. 134, p. 1649-1656, 2007.

SFORCIN, J. M.; AMARAA, J. T.; FERNANDES JR A.; SOUSAB, J. P. B.; BASTOS, J. K. Lemongrass effects on IL-1b and IL-6 production by macrophages. **Nat. Prod. Res.**, v. 23, p. 1151-1159, 2009.

SICA, A.; LARGHI, P.; MANCINO, A.; RUBINO, L.; PORTA, C.; TOTARO, M. G.; RIMOLDI, M.; BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin. Cancer. Biol.**, v. 18, p. 349-355, 2008.

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

SIVEEN, K.S.; KUTTAN, G. Role of macrophages in tumour progression. **Immunol. Lett.**, v. 123, p. 97-102, 2009.

SLAMENOVÁ, D.; HORVÁTHOVÁ, E.; WSÓLOVÁ, L.; SRAMKOVÁ, M.; NAVAROVÁ, J. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. **Mutat. Res.**, v. 677, 46-52, 2009.

SRIVASTAVA, S.K.; RAMANA, K.V. Focus on molecules: nuclear factor-kappaB. **Exp. Eye. Res.**, v. 88, p. 2-3, 2009.

STARCEVIC, S .L.; DIOTTE, N. M.; ZUKOWSKI, K. L.; CAMERON, M. J.; NOVAK, R. F. Oxidative DNA Damage and repair in a cell lineage model of human proliferative breast disease (PBD). **Toxicol. Sci.**, v. 75, p. 74-81, 2003.

SU, Y.W.; CHAO, S.H.; LEE, M.H.; OU, T.Y.; TSAI, Y.C. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E production in macrophages. **Planta Med.**, v. 76, p. 1666-1671, 2010.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 3, p. 768-780, 2003.

SUTER, L.; BABISS, L.E.; WHEELDON, E.B. Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. **Chem. Biol.**, v. 11, p.161-171, 2004.

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

TIWARI, M.; DWIVEDI, U.N.; KAKKAR, P. Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, p. 2913-2919, 2010.

TOCHIGI, Y.; YAMASHIKI, N.; OHGIYA, S.; GANAHA, S.; YOKOTA, H. Isoform-specific expression and induction of udp-glucuronosyltransferase in immunoactivated peritoneal macrophages of the rat. **Drug Metab. Dispos.**, v. 33, p. 1391-1398, 2005.

TOPLEY, N.; MACKENZIE, R.K.; WILLIAMS, J.D. Macrophages and mesothelial cells in bacterial peritonitis. **Immunobiology**, v. 195, p. 563-573, 1996.

TUCKER, O. N.; DANNENBERG, A. J.; YANG, E. K.; ZHANG, F.; TENG, L.; DALY, J. M.; SOSLOW, R.A.; MASFERRER, J. L.; WOERNER, B. M.; KOKI, A. T.; FAHEY, T. J. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. **Cancer Res.**, v. 59, p. 987-990, 1999.

TYAGI A.K.; MALIK, A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 10, p. 1-10, 2010.

USANEE, V.; RAWIWAN, P.; PRACHYA, K.; NIRUSH, L.; TAIJIRO, M. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in salmonella mutation assay. **Mutat. Res.**, v. 341, p. 71-75, 1994.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome. Biol.**, v. 3, p. 7, 2002.

VENKATARAMANAN, R.; KOMOROSKI, B.; STROM, S. *In vitro* and *in vivo* assessment of herb drug interactions. **Life Sci.**, v. 78, p. 2105-2115, 2006.

VON BORSTEL, R.C.; HIGGINS, J.A. Janus carcinogens and mutagens. **Mutat Res.**, v. 402, p.321-329,1998.

WATTENBERG, L.W. Chemoprevention of Cancer. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1-8, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO 2004. WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/index/assoc/s7148e/s7148e.pdf> acessado em: 17 de dezembro de 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO 2008. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>> acessado em: 22 de agosto de 2011.

WU, K.K. Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.**, v. 76, p. 89-93, 2005.

YAO, L.; LIU, F.; HONG, L.; SUN, L.; LIANG, S.; WU, K.; FAN, D. The function and mechanism of cox-2 in angiogenesis of gastric cancer cells. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 30, p. 13, 2011.

YIN, Y.; CHEN, X.; SHU, Y. Gene expression of the invasive phenotype of TNF-alpha-treated MCF-7 cells. **Biomed. Pharmacother.**, v. 63, p. 421-428, 2009.

YOGALAKSHMI, B.; VISWANATHAN, P.; ANURADHA, C. V. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology.**, v. 268, p. 204-212, 2010.

YU, Y.; WAN, Y.; HUANG, C. The biological functions of NF-kappaB1 (p50) and its potential as an anti-cancer target. **Curr. Cancer Drug. Targets**, v. 9, p. 566-571, 2009.

ZEIGER, E. Historical perspective on the development of the genetic toxicity test battery in the United States. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 51, p. 781-791, 2010.

ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Curr. Protoc. Immunol.**, cap. 14, unid. 14.1., 2008.

ZIEGLER-HEITBROCK L. The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS. **J. Endotoxin. Res.**, v. 7, p. 219-222, 2001.

ZOU, L.; HARKEY, M.R.; HENDERSON, G.L. Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. **Life. Sci.**, v. 71, p. 1579-89, 2002.

ANEXOS

TABELAS

Tabela 1. Danos no DNA (*tail intensity*) em macrófagos peritoneais de camundongos tratadas *in vitro* com o citral

Concentração µg/mL	Danos no DNA					
	Momentos de coleta					
	6h	p	10h	p	24h	p
CN	4,71± 0,79		7,90± 1,02		11,67± 1,57	
CP	44,86± 2,33*	<,0001	36,93± 2,47*	<,0001	49,48± 2,11*	<,0001
25	6,08± 0,93	0,1134	6,85± 1,05	0,3604	10,29± 1,61	0,4100
50	8,14± 1,17*	0,0010	7,49± 1,02	0,7255	10,80± 1,49	0,6107
100	7,14± 1,12*	0,0110	7,16± 1,14	0,5280	7,54± 1,25*	0,0060
					7,28± 1,17	
					46,38± 2,04*	<,0001
					8,16± 1,35	0,4618
					8,31± 1,10	0,3949
					8,57± 1,30	0,2926

CN: controle negativo; CP: controle positivo (doxorubicina - Sigma 34 µg/mL). Os resultados são expressos como média e erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

Tabela 2a. Danos no DNA (*tail intensity*) em células peritoneais de camundongos tratadas *in vitro* com o eugenol

Danos no DNA						
Concentração µg/mL	Momentos de coleta					
	6h	p	10h	p	24h	p
CN¹	8,61± 1,32		6,91± 1,00		11,78± 1,52	
CP²	39,50± 2,66*	<,0001	45,45± 2,54*	<,0001	41,95± 2,51*	<,0001
0,62	12,56± 1,64*	0,0154	6,36± 0,92	0,5937	14,87± 1,75	0,1244
1,24	14,46± 1,77*	0,0011	9,57± 1,17*	0,0377	14,05± 1,59	0,2435
2,48	9,45± 1,34	0,5437	10,9± 1,57*	0,0039	11,16± 1,26	0,7179
					8,24± 0,99	
					48,28± 2,37*	<,0001
					17,64± 1,74*	<,0001
					13,96± 1,71*	0,0009
					16,50 ± 2,10*	<,0001

CN: controle negativo; CP: controle positivo (doxorubicina - Rubidox 1 mg/mL). Os resultados são expressos como média e erro padrão de três experimentos independentes. **p* < 0,05 em relação ao controle negativo.

Tabela 2b. Danos no DNA (*tail intensity*) em células peritoneais de camundongos tratadas *in vitro* com o eugenol

Concentração µg/mL	Danos no DNA					
				Momentos de coleta		
	12 horas	p		24 horas	p	36 horas p
CP	51,61± 2,43			45,25± 2,04		46,83± 1,97
CN	4,70± 0,78			3,11± 0,522		5,22± 0,69
0,31	3,26± 0,48	0,379		11,22± 1,40*	<,0001	4,94± 1,29 0,7330

CN: controle negativo; CP: controle positivo (DOX - Sigma 34 µg/mL). Os resultados são expressos como média e desvio padrão de dois experimentos independentes. **p* < 0,05 em relação ao controle negativo.

Tabela 3. Danos no DNA (*tail intensity*) em células peritoniais de camundongos tratadas *in vitro* com o citral e com a doxorrubicina (34 µg/mL) em três protocolos distintos

Tratamento	<i>citral</i> µg/mL	Danos no DNA					
		Momentos de coleta					
		12 horas	<i>p</i>	24 horas	<i>p</i>	36 horas	<i>p</i>
Pré- tratamento	CP	47,47± 2,01		45,94± 2,13		46,20± 2,46	
	CN	3,46± 0,81*	<,0001	11,45± 1,68*	<,0001	8,48± 1,47*	<,0001
	25 +CP	38,53± 2,26	0,0562	36,31± 2,03*	0,0320	41,96± 2,49	0,3749
	50 +CP	30,08± 1,83*	<,0001	28,75± 2,26*	<,0001	40,11± 2,37	0,1934
	100 +CP	34,31± 2,19*	0,0034	30,57± 2,29*	0,0003	31,73± 2,47*	0,0008
Pós- tratamento	CP	49,65± 1,97		44,60± 2,08		48,58± 2,08	
	CN	5,64± 0,95*	<,0001	11,72± 1,40*	<,0001	7,84± 1,18*	<,0001
	25 +CP	36,00± 2,25*	0,0030	44,84± 2,49	0,9610	35,17± 2,25*	0,0028
	50 +CP	27,20± 1,94*	<,0001	30,55± 2,15*	0,0005	50,85± 2,48	0,6648
	100 +CP	32,67± 2,12*	0,0001	27,67± 2,00*	<,0001	36,88± 2,37*	0,0104
Tratamento simultâneo	CP	51,80± 2,12		45,35± 2,38		50,38± 2,19	
	CN	4,83± 0,79*	<,0001	7,14± 1,07*	<,0001	7,03± 1,18*	<,0001
	25 +CP	34,20± 1,99*	<,0001	32,94± 2,18*	0,0024	39,22± 2,29*	0,0163
	50 +CP	36,17± 2,11*	0,0007	41,28± 2,42	0,3628	43,12± 2,57	0,1321
	100 +CP	43,92± 2,15	0,1104	37,57± 2,44	0,0702	40,99± 2,44*	0,0469

CN: controle negativo; CP: controle positivo (doxorrubicina – Sigma). Os resultados são expressos como média e erro padrão de três experimentos independentes. **p* < 0,05 em relação ao controle positivo.

Tabela 4. Danos no DNA (*tail intensity*) em células peritoniais de camundongos tratadas *in vitro* com o eugenol e com a doxorrubicina (34 µg/mL) em três protocolos distintos

Tratamento	eugenol		Danos no DNA				
	µg/mL		Momentos de coleta				
		12 horas	p	24 horas	p	36 horas	p
Pré-tratamento	CP	57,12± 1,98		49,57± 2,30		50,27± 2,18	
	CN	7,07± 1,14*	<,0001	3,14± 0,51*	<,0001	3,77± 0,48*	<,0001
	0,31 +CP	47,68± 2,62	0,1246	32,79± 2,62*	0,0008	37,46± 2,58*	0,0146
	0,62 +CP	40,36± 2,34*	0,0010	30,32± 2,05*	<,0001	31,60± 2,22*	<,0001
	1,24 +CP	46,44± 2,18*	0,0459	34,64± 2,09*	0,0007	33,00± 2,15*	<,0001
	2,48 +CP	47,84± 2,18	0,0865	42,64± 2,38	0,1448	46,88± 2,09	0,4973
Pós-tratamento	CP	56,47± 2,23		44,35± 1,88		40,97± 1,89	
	CN	3,83± 0,58*	<,0001	4,16± 0,98*	<,0001	5,65± 0,55*	<,0001
	0,31 +CP	50,20± 2,47	0,3291	33,26± 2,58*	0,0211	22,94± 2,27*	<,0001
	0,62 +CP	46,52± 2,42	0,0709	39,69± 2,44	0,2994	37,66± 2,24	0,4307
	1,24 +CP	32,19± 1,93*	<,0001	31,96± 2,23*	0,0027	35,25± 2,02	0,1607
	2,48 +CP	49,04± 2,42	0,1865	39,94± 2,47	0,3278	35,78± 2,06	0,2059
Tratamento simultâneo	CP	51,61± 2,43		45,25± 2,04		46,83± 1,97	
	CN	4,70± 0,78*	<,0001	3,11± 0,52*	<,0001	5,22± 0,69*	<,0001
	0,31 +CP	41,84± 2,76	0,0833	35,13± 2,72*	0,0386	21,88± 2,35*	<,0001
	0,62 +CP	41,12± 2,32*	0,0328	31,47± 2,27*	0,0008	47,33± 2,31	0,9207
	1,24 +CP	27,38± 2,21*	<,0001	35,21± 2,32*	0,0188	38,87± 2,26	0,0792
	2,48 +CP	41,56± 2,01*	0,0416	42,22± 2,46	0,5109	33,48± 2,14*	0,0019

CN: controle negativo; CP: controle positivo (doxorrubicina – Sigma). Os resultados são expressos como média e erro padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle positivo.