

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

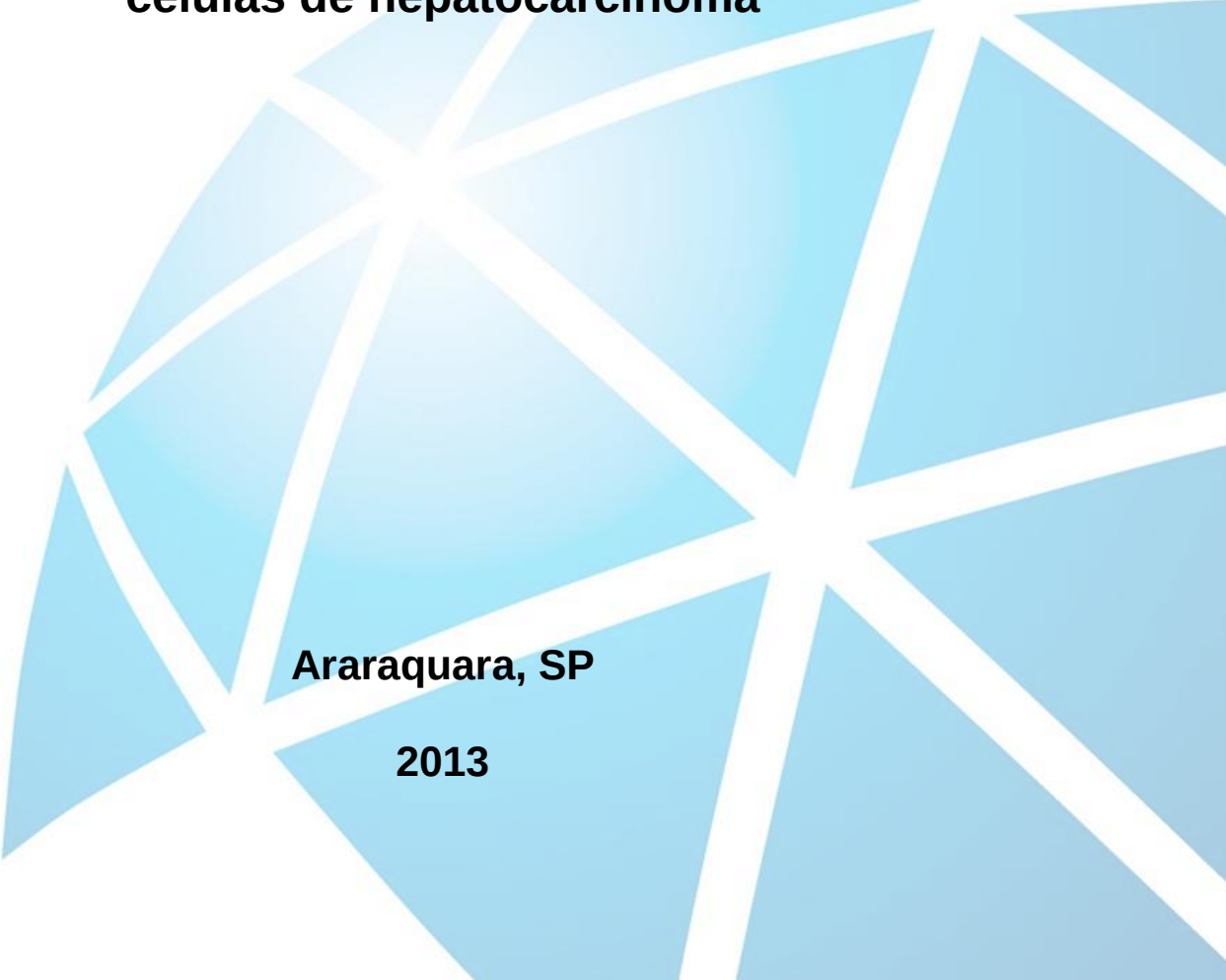
Tese de Doutorado

THAIS DE OLIVEIRA RODRIGUES SANZOVO FALCOSKI

**Atividade quimiopreventiva das substâncias de
Inga laurina por abordagem proteômica em
células de hepatocarcinoma**

Araraquara, SP

2013



THAIS DE OLIVEIRA RODRIGUES SANZOVO FALCOSKI

Atividade quimiopreventiva das substâncias de *Inga laurina* por abordagem proteômica em células de hepatocarcinoma

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, como arte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane Pienna Soares
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Marisa Fusco Almeida
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Valente

ARARAQUARA-SP

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F184a

Falcoski, Thaís de Oliveira Rodrigues Sanzovo
Atividade quimiopreventiva das substâncias de *Inga laurina* por abordagem proteômica / Thaís de Oliveira Rodrigues S. Falcoski – Araraquara, 2014
69 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Christiane Pienna Soares

Coorientador: Valéria Valente

Coorientador: Ana Maria Fusco Almeida

1. Citotoxicidade. 2. Inga Laurina. 3. Genotoxicidade. I. Soares, Christiane Pienna, oriente. II. Valente, Valéria, coorient. III. Almeida, Ana Maria Fusco, coorient. IV. Título.

A Deus, por ter suprido todas as minhas necessidades, não me deixando faltar nada,

*Aos meus pais Ulisses e Laura, que com muito amor me têm
guiado até aqui, fazendo parte desse sonho e me ajudando a
subir a escada da vida,*

*A minha mãe Sylvia e aos meus irmãos Daniel e
Mariana, pelos momentos de felicidade, alegria e
companhia,*

*A minha tia Helcisa e minha prima Anna Luísa, que
acompanharam tudo bem de perto, me ajudando a superar os
momentos difíceis,*

*Ao meu esposo Marco Aurélio, que durante todo o tempo
tem me dado muito amor e carinho, sendo meu companheiro
de todas as horas,*

Dedico com carinho

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Marco Aurélio, por estar sempre presente tanto nas horas tristes, como nas alegres;

Aos meus pais, Ulysses e Laura, pelo exemplo de vida, pelo amor, incentivo e apoio em todas as decisões;

A minha mãe, meus irmãos, tia, prima e demais parentes que sempre estão na arquibancada da vida, torcendo por mim;

Aos amigos Fernanda e Fábio, por estarem sempre presentes e pela infinita amizade;

À professora Christiane Pienna Soares por ter me incentivado a seguir esta trilha, pela paciência, confiança e por ser um grande exemplo de persistência e superação;

Ao pessoal do laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular, que dividiram os longos dias partilhando de todos os momentos da vida e desse projeto;

Aos laboratórios vizinhos, Micologia Clínica, Bioquímica Clínica e Imunologia, por compartilharem várias vezes parte de sua estrutura para que este projeto fosse realizado;

Aos funcionários da Fcfar-unesp que colaboraram com seu excelente trabalho direta ou indiretamente para esta conquista;

Ao Professor José Cesar da Rosa, que gentilmente nos ajudou nos experimentos de proteômica;

Ao Laboratório de Química de Proteínas da USP de Ribeirão Preto pelo acolhimento e amizade;

À Fcfar-unesp pelo acolhimento e estrutura proporcionada;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e CAPES, pela concessão de bolsa de estudo;

A todos os que contribuíram com esse trabalho...

Aos que também de alguma forma contribuíram com o meu crescimento profissional...

MUITO OBRIGADA

“Não confunda derrotas com fracasso, nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

Inga laurina, é uma árvore nativa da América tropical e subtropical, distribuída em todo o mundo, sendo utilizada amplamente como árvore de sombra e seus frutos comestíveis. Seus frutos são do tipo vagem e contêm grande quantidade de sementes, e ainda são comestíveis. A composição química deste vegetal é rica em compostos fenólicos, os quais podem ser responsáveis pela atividade antioxidante relatada em seus extratos e frações. O presente estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade, por meio do ensaio de MTT, genotoxicidade e antigenoxidade através do ensaio do cometa, além de verificar a capacidade quimiopreventiva com o ensaio de indução da enzima quinona redutase. As amostras avaliadas foram três substâncias puras, isoladas da fração acetato de etila obtida de folhas e ramos de *Inga laurina* através do Ensaio do Cometa. Os experimentos demonstraram que as substâncias testadas não são citotóxicas, não induzem a enzima quinona redutase e não causam danos genotóxicos pelo ensaio do cometa. Foi observada uma proteção na avaliação da antigenotoxicidade em todas as substâncias testadas e um reparo contra danos causados por peróxido de hidrogênio em três das substâncias. No experimento de proteômica, avaliaram-se as proteínas expressas em células HepG2 na condição de reparo observada no ensaio de antigenotoxicidade. Foram encontradas proteínas diretamente relacionadas com a eliminação de ROS (espécies reativas de oxigênio), reparo de DNA, proteínas tumorais e de apoptose. Não foi possível identificar uma via específica de reparo, já que muitas dessas proteínas são multifuncionais.

ABSTRACT

Inga Laurina is a tree native to tropical and subtropical America, distributed worldwide and is widely used as a shade tree and its edible fruit its fruits are pod type and contains lots of seeds, and are still edible . The chemical composition of this plant is rich in phenolic compounds, which may account for their reported in extracts and fractions antioxidant activity. The present study aimed to evaluate the cytotoxicity through MTT assay, genotoxicity and antigenotoxicity through the comet assay, besides verifying the chemopreventive ability to test induction of quinone reductase enzyme. The samples were evaluated three pure, isolated compounds from the ethyl acetate fraction obtained from leaves and branches of *Inga Laurina* by Comet Assay. The experiments showed that the tested substances are not cytotoxic, do not induce quinone reductase enzyme and do not cause genotoxic damage by the comet assay. A protection was observed in the evaluation of antigenotoxicity in all tested substances and repair damage caused by hydrogen peroxide in three substances. In proteomics experiment, we analyzed the proteins expressed in HepG2 cells repair the condition observed in the test antigenotoxicity. Proteins directly related to the elimination of ROS (reactive oxygen species), DNA repair, apoptosis and tumor proteins were found. Unable to identify a specific repair, since many of these proteins are multifunctional pathway.

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Histórico	15
1.2. Quimioprevenção.....	17
1.3. Ensaio da Quinona-redutase (QR)	18
1.4. Genotoxicidade	19
1.4.1. Ensaio Cometa.....	20
1.5. <i>Inga laurina</i>	21
1.5.1. Substâncias Fenólicas	22
1.5.2. Antioxidantes.....	23
1.6. Proteômica.....	25
2. OBJETIVOS	26
2.1. OBJETIVOS GERAIS	27
2.2. Objetivos Específicos.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. <i>Inga laurina</i>	29
3.2. Manutenção das linhagens	29
3.3. Avaliação da citotoxicidade.....	29
3.4. Ensaio da quinona-redutase (QR)	30
3.4.1. Reagentes.....	30
3.4.2. Quantificação da atividade de quinona-redutase	31
3.5. Ensaio do Cometa.....	32
3.5.1. Soluções para o ensaio do Cometa.....	32
3.5.2. Avaliação de Genotoxicidade	32
3.5.3. Avaliação de Antigenotoxicidade	33
3.6. Análise Proteômica	35
3.6.1. Extração e Quantificação de Proteínas das Linhagens Celulares.....	35
3.6.2. Preparação do Extrato Protéico para <i>Shotgun Proteomics</i> e Marcação Isobárica com Itraq	36

3.6.3.	Digestão com tripsina	36
3.6.4.	Marcação das amostras com isóbaros iTRAQ	37
3.6.5.	Cromatografia em Coluna de Troca Iônica (Scx)	37
3.7.	Espectrometria de Massas.....	37
3.7.1.	MALDI-ToF-ToF.....	37
3.7.2.	Identificação das proteínas utilizando o “Software” Mascot	38
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
5.1	Avaliação das substâncias isoladas da fração acetato de etila obtidas de folhas e caules de <i>Inga laurina</i>	40
5.1.1	Ensaio de citotoxicidade.....	40
5.2.2	Atividade de Indução de Quinona-redutase.....	40
5.2.3	Avaliação da Genotoxicidade	42
5.2.4	Avaliação da Antigenotoxicidade (Pré tratamento).....	45
5.2.5	Avaliação da Antigenotoxicidade (Pós-tratamento)	47
5.3	Análise Proteômica	50
6	CONCLUSÃO	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Princípio do ensaio da quinona-redutase (FAHEY *et al.*, 2004). 19

Figura 2. Distribuição das proteínas diferencialmente expressas da linhagem celular HEPG2 por categoria funcional, sequenciadas por MALDI-TOF/TOF e identificadas pelo software Mascot. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação da viabilidade celular das substâncias puras isoladas das folhas e ramos <i>I. laurina</i> , em linhagem de células HepG2, por meio da técnica de SRB.....	40
Tabela 2: Atividade da enzima quinona-redutase através da substância 5-3 extraída de <i>Inga laurina</i> em linhagem de células Hepa1c1c7.	41
Tabela 3: Atividade da enzima quinona-redutase através da substância 5-5 extraída de <i>Inga laurina</i> em linhagem de células Hepa1c1c7.	41
Tabela 4: Atividade da enzima quinona-redutase através da substância 5-6 extraída de <i>Inga laurina</i> em linhagem de células Hepa1c1c7.	42
Tabela 5: Atividade da enzima quinona-redutase através da substância 5-7 extraída de <i>Inga laurina</i> em linhagem de células Hepa1c1c7.	42
Tabela 6: Avaliação da genotoxicidade da Substância 5-3 de <i>Inga laurina</i>	43
Tabela 7: Avaliação da genotoxicidade Substância 5-5 de <i>Inga laurina</i>	44
Tabela 8: Avaliação da genotoxicidade da Substância 5-6 de <i>Inga laurina</i>	44
Tabela 9: Avaliação da genotoxicidade da Substância 5-7 de <i>Inga laurina</i>	45
Tabela 10: Avaliação da antigenotoxicidade pré-tratamento com H ₂ O ₂ da Substância 5-3 de <i>Inga laurina</i>	46
Tabela 11: Avaliação da antigenotoxicidade pré-tratamento com H ₂ O ₂ Substância 5-5 de <i>Inga laurina</i>	46
Tabela 12: Avaliação da antigenotoxicidade pré-tratamento com H ₂ O ₂ da Substância 5-6 de <i>Inga laurina</i>	47
Tabela 13: Avaliação da antigenotoxicidade pré-tratamento com H ₂ O ₂ da Substância 5-7 de <i>Inga laurina</i>	47
Tabela 14: Avaliação da antigenotoxicidade pós-tratamento com H ₂ O ₂ da Substância 5-3 de <i>Inga laurina</i>	48
Tabela 15: Avaliação da antigenotoxicidade pós-tratamento com H ₂ O ₂ Substância 5-5 de <i>Inga laurina</i>	48
Tabela 16: Avaliação da antigenotoxicidade pós-tratamento com H ₂ O ₂ da Substância 5-6 de <i>Inga laurina</i>	49
Tabela 17: Avaliação da antigenotoxicidade pós-tratamento com H ₂ O ₂ da Substância 5-7 de <i>Inga laurina</i>	49

Tabela 18: Identificação das proteínas detectadas a partir de células HepG2 tratadas com a substância 5-3 com score ≥ 3051

Tabela 19: Identificação das proteínas detectadas a partir de células HepG2 tratadas com a substância 5-5 com score ≥ 3052

Tabela 20: Identificação das proteínas detectadas a partir de células HepG2 tratadas com a substância 5-6 com score ≥ 3052

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

O Brasil possui aproximadamente um terço da flora mundial com uma biodiversidade elevada, estimada em cerca de 20 % do número total de plantas do planeta (CALIXTO, 2003). Essa megadiversidade se distribui em diferentes regiões como a Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado.

O Cerrado compreende 25 % do território brasileiro e se caracteriza pela baixa fertilidade do solo e predomínio de uma longa estação seca, que condicionam o desenvolvimento de um tipo peculiar de vegetação, muito atraente pela riqueza em espécies medicinais e pela beleza dos aspectos estéticos que apresenta (CRAGG *et al.*, 1997). A grande diversidade de espécies presentes nesse ecossistema fornece material para a realização de estudos especializados na procura de novos fármacos para diferentes doenças, entre elas o câncer (BALANDRIN *et al.*, 1993).

Os produtos naturais possuem um papel altamente significativo no desenvolvimento de novos fármacos. Especificamente àqueles de doenças infecciosas e do câncer, estima-se que mais de 75 e 60 %, respectivamente, dos fármacos atualmente empregados, são derivados de fontes naturais (NEWMAN, *et al.*, 2003; CRAGG AND NEWMAN, 2005). No geral, estima-se que 40 % dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, onde 25 % foram extraídos de plantas, 13 % de microrganismos e 3 % de animais (CALIXTO, 2003).

Esse imenso patrimônio genético de fontes naturais, já escassos em países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. A razão dessa afirmação é facilmente comprovada quando se analisa o número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais. (CRAGG *et al.*, 1997; CALIXTO, 2003). Por outro lado, estudos prévios demonstram que apenas cerca de 8 % das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de substâncias bioativas e aproximadamente 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais e tóxicas (POTTERAT & HOSTETTMANN, 1995).

O potencial da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos a partir de extratos vegetais ainda é considerado pouco explorado. Atualmente, estima-se que

das 500 mil espécies de plantas, apenas uma porcentagem pequena tem sido investigada do ponto de vista fitoquímico. Estima-se que apenas 5000 espécies têm sido estudadas para uso na medicina (PAYNE *et al.*, 1991; RATES, 2001). Estima-se também que 70% das plantas existentes no planeta ocorrem em apenas 11 países: Austrália, Brasil, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, México e Peru (NOGUEIRA; CERQUEIRA; SOARES, 2010).

Considerando a diversidade vegetal do Brasil e a pequena porcentagem de espécies de plantas investigada tanto do ponto de vista fitoquímico, como farmacológico e toxicológico, o reino vegetal apresenta um enorme reservatório de substâncias farmacologicamente ativas a serem descobertas (POTTERAT *et al.*, 1995; NOGUEIRA; CERQUEIRA; SOARES, 2010).

Atualmente em vários laboratórios, uma grande variedade de plantas medicinais tem sido estudada na busca de substâncias com propriedades antitumorais (LIU *et al.*, 2004; MOONGKARNDI *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2005; WINTERS, 2006). A quantidade de estudos utilizando produtos naturais na área da quimioterapia do câncer é intenso, sendo que 74 % das substâncias antitumorais são originados de produtos naturais ou derivados (TAN *et al.*, 2006). Muitos desses produtos naturais são capazes de alterar o metabolismo de carcinógenos por meio da indução de enzimas microssomais envolvidas na detoxificação do organismo (SONG *et al.*, 1999). A carcinogênese, portanto, pode ser evitada por uma série de substâncias de diferentes classes como flavonoides, alcaloides, cumarinas, tiocarbamatos, antioxidantes fenólicos e isotiocianatos que podem agir como agentes quimiopreventivos do câncer, uma vez que podem prevenir, suprimir ou reverter o processo de carcinogênese por meio da ingestão desses na dieta ou na forma de medicamentos (SONG *et al.*, 1999).

Em vista da necessidade de se encontrar novos fármacos, tem-se procurado identificar substâncias isoladas de plantas brasileiras capazes de inibir a proliferação celular. Outro desafio é encontrar substâncias que induzam a morte de células malignas, sem, contudo ocasionar elevada citotoxicidade, genotoxicidade ou mutagenicidade em células não neoplásicas.

1.2. Quimioprevenção

Vários fatores como crescimento da população, envelhecimento, urbanização, uso de tabaco, ausência de atividade física e dietas altamente calóricas, refinadas e insalubres estão relacionados com números crescentes de indivíduos com doenças crônicas de coração, AVC, diabetes, dentre outras (MARQUES 2011). Muitos estudos relacionam um estilo de vida natural e saudável aliado com produtos naturais introduzidos na dieta reduzem o risco destas doenças crônicas por meio da quimioprevenção (SILVA *et al.*, 2007).

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como a utilização de substâncias químicas específicas, naturais ou sintéticas, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese (WATTENBERG, 1985). A quimioprevenção do câncer pode ocorrer por meio da administração de uma ou mais substâncias químicas durante as etapas iniciais pré-neoplásicas da carcinogênese (SPORN *et al.*, 1976; ALBERTSD & GARCIA, 1995; PEZZUTO, 1997; TAMINI *et al.*, 2002; SCOLASTICI, 2008; AMIN 2009).

Os quimioprotetores podem ser classificados em três categorias, de acordo com seus efeitos nas diferentes fases da carcinogênese: 1) inibidor da formação do carcinógeno; 2) bloqueador de metabólito ativo e, 3) supressor do desenvolvimento neoplásico (WATTENBERG, 1985). O uso de produtos naturais como agentes quimiopreventivos, que inibem os eventos iniciais da formação de tumores, tem sido difundido em função da quantidade crescente de resultados positivos sobre a inclusão de alimentos ricos em antioxidantes na dieta (SILVA *et al.*, 2007). Muitas substâncias quimiopreventivas potenciais estão presentes nos alimentos como polifenóis, isoflavonas, curcumina, arilpropanóides, isocianato, sulforofano, licopenos, ácidos salicílicos, cafeína entre outras. Tais substâncias têm-se mostrado grandes aliadas no tratamento dos linfomas, dos tumores da infância e das neoplasias de células germinativas (KELLOFF *et al.*, 2000). Adicionalmente, muitos produtos naturais ou seus derivados têm mostrado atividade marcante na inibição da proliferação de células tumorais (STONER *et al.*, 1997; SCOLASTICI, 2008, BOZETO, 2011).

Algumas das estratégias para a proteção de células dos eventos iniciais da formação de tumores incluem a inibição de enzimas responsáveis pela geração de

espécies reativas (enzimas de fase I), ao passo que enzimas da fase II são estimuladas, promovendo a desativação de radicais e eletrófilos envolvidos nos processos celulares normais (STONER *et al.*, 1997). Os agentes responsáveis por este acontecimento são denominados indutores bifuncionais, onde os carcinógenos poderiam induzir a uma proteção contra seu próprio efeito tóxico (PROCHASKA *et al.*, 1992). Além destes, existem os indutores monofuncionais, que somente induzem enzimas de fase II seletivamente e ativam elementos de resposta antioxidante (CUENDET *et al.*, 2006). A redução de quinonas eletrofílicas pela quinona redutase se constitui numa via importante de detoxificação e o seu grau de atividade pode ser inferido por meio da indução em células da linhagem de hepatocarcinoma murino Hepa 1c1c7.

A indução de enzimas de fase II pode proteger os sistemas biológicos contra espécies químicas tóxicas e reativas, e estudos recentes demonstram que a elevação dessas enzimas, como a NADPH: quinona redutase e GST (Glutathione S-transferase) estão correlacionadas com a proteção celular nos estágios iniciais e intermediários contra a carcinogênese induzida por agentes químicos em modelos animais (WATTENBERG, 1985; SONG *et al.*, 1999; CUENDET *et al.*, 2006).

1.3. Ensaio da Quinona redutase (QR)

O ensaio da quinona redutase (QR) constitui um método simples para detecção e avaliação da indução da enzima quinona redutase, que detoxifica carcinógenos (enzima de fase II), baseado na medida direta da atividade da QR em células de hepatocarcinoma celular. (PROCHASKA *et al.*, 1992). A glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato (G6PDH) geram NADPH continuamente. Este NADPH é usado pela QR para transferir elétrons a menadiona. O menadiol então formado reduz espontaneamente o MTT ao azul de formazana que pode ser medido em comprimentos de onda de 490 a 640 nm (PROCHASKA & SANTAMARIA 1988; FAHEY *et al.*, 2004). Ambos NADPH e menadiona são regenerados, o que evita problemas de depleção dos substratos (FIGURA 1).

A linhagem derivada de hepatocarcinoma celular murino-Hepa1c1c7 contém quantidades de QR induzíveis facilmente mensuráveis que fornece um confiável

sistema de detecção de indutores de enzimas de fase II (PROCHASKA & SANTAMARIA 1988; FAHEY et al., 2004; CUENDET et al., 2006).

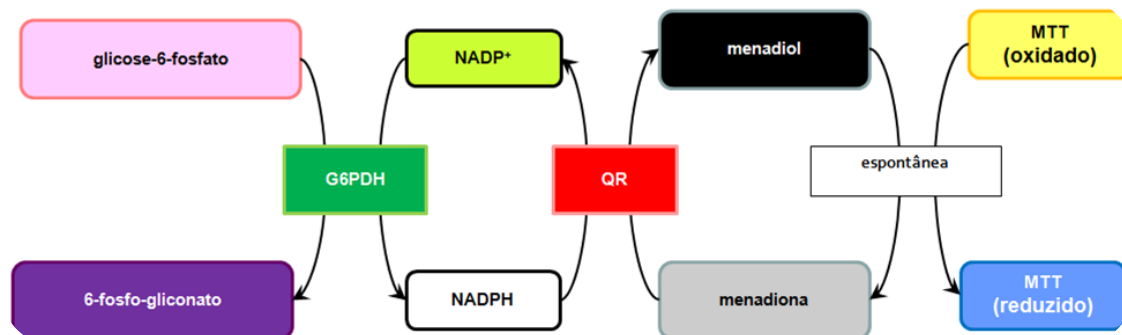


Figura 1: Princípio do ensaio da quinona redutase (FAHEY et al., 2004).

1.4. Genotoxicidade

Desde os tempos mais remotos, plantas medicinais são utilizadas para tratar doenças. Historicamente, as plantas e os microrganismos têm provido à indústria farmacêutica substâncias importantes para a síntese de novos fármacos. Ainda, as plantas medicinais se tornaram uma importante fonte de quimioterápicos (CAVALCANTE et al., 2007). Atualmente, a validação do uso terapêutico de plantas medicinais é considerado uma etapa crucial no desenvolvimento de agentes fitoterápicos (CAVALCANTE et al., 2007).

Dessa forma, metabólitos de plantas vêm sendo estudados a fim de avaliar sua capacidade de modificar a atividade de agentes mutagênicos e carcinogênicos. As plantas possuem uma série de substâncias que podem apresentar efeito protetor contra danos no DNA (DHIR et al., 1993; COZZI et al., 1997; CAVIN et al., 2001).

Os danos causados ao DNA por mutagênicos ambientais podem ser nocivos para diversos organismos, incluindo os seres humanos.

O acúmulo de mutações está relacionado ao desenvolvimento da maioria dos tumores malignos e desordens degenerativas, assim como a idade e anomalias genéticas (CUZZOCREA et al., 2001; MIGLIORE & COPPEDE, 2002). A fim de prevenir o risco genotóxico, é pertinente tanto identificar os mutagênicos e diminuir a exposição a eles, como também, aumentar a exposição a substâncias antígeno-tóxicas como as que ocorrem nas plantas (IKUMA et al., 2006; JEONG et al., 2006). Kundu e Surh (2005) relataram que 7 a 31 % dos tumores malignos

podem ser reduzidos com dietas ricas em frutas e vegetais e desde então estudos vêm sendo conduzidos, a fim de identificar substâncias que possam apresentar atividade antigenotóxica (CARIÑO-CORTÉS *et al.*, 2007).

1.4.1. Ensaio Cometa

O ensaio do cometa é um método sensível e versátil para medição de quebras de fita simples e dupla no DNA (COLLINS *et al.*, 2008). O ensaio do cometa foi desenvolvido empiricamente por meio de dois protocolos relativamente simples descritos na literatura por Singh *et al.* em 1988 e Olive em 1989. O primeiro protocolo foi desenvolvido para mensurar pequenos níveis de quebras de DNA com alta sensibilidade, enquanto o segundo foi otimizado para detectar uma subpopulação celular com sensibilidade variável a determinadas substâncias ou radiação.

No presente estudo, procedimentos de Singh *et al.* foram selecionados para os estudos de genotoxicidade (FAIRBAIRN *et al.*, 1995). O pH alcalino do ensaio do cometa permite detectar um espectro amplo de lesões ao DNA, incluindo quebras únicas, sítios álcali-lábeis e ligações cruzadas (TICE *et al.*, 2000). As vantagens desse teste incluem sua aplicabilidade a vários tecidos e/ou tipos celulares, a grande sensibilidade em detectar pequenos níveis de danos no DNA, a necessidade de utilizar um pequeno número de células por amostra, sua fácil execução, o curto tempo necessário para obter resultados e por ser econômico (TICE *et al.*, 2000). Mais especificamente, o ensaio cometa pertence à classe de testes indicadores, pois é capaz de detectar danos precoces de DNA e que podem futuramente originar mutações. Quando comparado a testes como o de micronúcleo ou de aberrações cromossômicas, o ensaio cometa mostra-se capaz de detectar danos mais recentes e passíveis de serem reparados (BRENDLER-SCHWAAB *et al.*, 2005; MOLLER, 2005).

Nos casos onde é relevante especular que determinado tratamento induz danos ao DNA em órgãos específicos (estômago, rins, bexiga, etc.), o ensaio cometa é considerado o método mais confiável (BRENDLER-SCHWAAB *et al.*, 2005).

1.5. *Inga laurina*

Fabaceae é uma das maiores e mais importantes famílias botânicas, distribuídas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Seus frutos em forma de vagem são comestíveis e contêm semente envolta por uma polpa flocosa branca e adocicada (MARQUI, 2011). A *Inga laurina*, é popularmente conhecida como: Ingá-branco, Ingá-de-chichica, Ingá-de-macaco, Ingá-de-praia, Ingá-mirim ou Ingaí e espécie essa que possui distribuição difundida na América do Sul e Central (LORENZI, 2002).

O gênero *Inga* é nativo da América tropical e subtropical e inclui aproximadamente 250 espécies. Inúmeras são usadas por tribos do oeste da Amazônia para tratar muitas doenças. Integrantes da tribo Tikunas com a finalidade de reduzir as flatulências, ingerem sementes de *I. brachystachya*. Utilizam também folhas e raízes de *I. strigillosa* Benth para tratar ferimentos na pele (MARQUI, 2011). Na tribo Makunas, utilizam compressas de flores de *I. cecropietorum* Ducke para reduzir dores de ouvido. Flores moídas de *I. rubiginosa* (Rich.) são utilizadas por índios Kubeos como descongestionante nasal durante resfriados e limpam secreções nas pálpebras com polpa das vagens de *I. pilosule* Rich Macbride. Os aborígenes ribeirinhos de Putumayo usam polpa de frutos de *Inga macrophylla* Willd para limpar os dentes. As flores de *I. myriocephala* Pittier são utilizadas pela tribo Taiwano para fortalecer o cabelo e os caules e folhas de *I. verna* são usados para curar espinhas e feridas (VIVOT et al. 2001).

Foram caracterizadas substâncias de diferentes espécies do gênero *Inga*, como: saponinas da casca de *I. marginata*, esteróis glicosilados e flavonoides das raízes de *I. edulis*, diferentes ácidos pipecólicos hidroxilados em *I. brenesii*, *I. longispica*, *I. oerstediana* e *I. paterno*, açúcares (particularmente D-frutose e sacarose) de *I. spectabilis*, ácido ascórbico de *I. fagifolia* e altas concentrações de substâncias fenólicas em *I. brenesii*, *I. densiflora*, *I. longispica*, *I. mertoniana* e *I. punctata* (VIVOT et al. 2001; MARQUI, 2011).

As folhas jovens de *I. laurina* apresentam altas concentrações de derivados de tirosina esterificados com unidades de ácido gálico. Foram realizados bioensaios com lagartas *Heliothis virescens*, utilizando uma dieta com 10% em massa de tirosina. Foi observado a redução do crescimento da lagarta em 2% do seu

comprimento, sendo eficiente no controle biológico de pragas agrícolas (LOKVAM *et al.*, 2007; MARQUI, 2011).

Estudos fitoquímicos revelaram que o ácido gálico e o ácido elágico presentes no extrato são os principais responsáveis pela atividade antioxidante, sendo útil para o tratamento de muitos tipos de doenças relacionadas com estresse oxidativo (VIVOT *et al.* 2001).

1.5.1. Substâncias Fenólicas

As substâncias fenólicas são responsáveis pelo sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Esse grupo de substâncias é responsável pela proteção das plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias (MARQUI, 2011).

Certas espécies vegetais acumulam substâncias fenólicas para inibir o crescimento de outras plantas competidoras, exercendo ação alelopática. Exemplos de substâncias fenólicas com ação alelopática são o ácido caféico e o ácido ferúlico (PERES, 2007; GOBBO-NETO *et al.*, 2007).

Substâncias fenólicas possuem anel aromático com um ou mais grupamento hidroxila, sendo biossintetizadas a partir de duas rotas metabólicas principais; a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico (DEWICK, 2002). O ácido chiquímico é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose, ou seja, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato. A via do mevalonato, também designada via da HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase), o piruvato continua oxidando até a formação de unidades de acetil-coenzima A (acetil-coA) e a formação do ácido mevalônico (OOTANI, 2010; MARQUI 2011).

Há vários relatos na literatura apontando substâncias biologicamente ativas, indicando que essa classe de substâncias é promissora na descoberta de novos fármacos. (MARQUI, 2011).

Flavonoides, taninos, antocianinas e outros constituintes fenólicos possuem potencial antioxidante, impedindo o efeito danoso dos radicais livres. Visando a melhoria e sustentação da saúde, é de vital importância o consumo dessas fontes naturais de substâncias para nosso organismo, pois os fenólicos contribuem para a manutenção do equilíbrio pró - e antioxidante de sistemas biológicos,

desempenhando função essencial na prevenção de várias doenças (SIMÕES *et al.*, 1999; MARQUI, 2011).

1.5.2. Antioxidantes

A oxidação é um dos maiores causadores de degradação de materiais e alimentos. As espécies reativas de oxigênio, em particular, radicais livres, têm sido as responsáveis por muitas doenças incluindo câncer e arteriosclerose (MARQUI, 2011). Na tentativa de minimizar os efeitos danosos dos radicais livres, organismos aeróbicos desenvolveram mecanismos de proteção antioxidante que envolvem sistemas enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH) e sistemas antioxidantes compostos por micromoléculas como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), carotenoides e flavonoides, entre outros (BARREIROS, 2006).

Embora o organismo tenha capacidade de prevenir reações indesejáveis e reparar biomoléculas de tecidos danificados, estes mecanismos de defesa não são suficientemente abrangentes para reparar todos os danos causados por tais reações, ocorrendo o acúmulo de substâncias prejudiciais ao nosso corpo. Esta situação de desequilíbrio entre a formação de espécie com poder oxidante e a sua destruição denomina-se estresse oxidativo e pode conduzir a um metabolismo anormal, disfunção celular, à perda de funções fisiológicas, a doenças e à morte celular e/ou tecidual (MARQUI, 2011).

Os processos oxidativos podem ser evitados por meio da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes, já que estes têm propriedades de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (GORDON, 1996).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de substâncias simples como polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcóxila e peróxila, por meio da doação de átomos de hidrogênio a estas substâncias, interrompendo a reação em cadeia.

Isso tem levado à intensificação de pesquisas relacionadas com as possíveis contribuições de antioxidantes (MARQUI 2011).

A elevada capacidade seqüestrante dos radicais livres é verificada por um grande número testes que mensuram a atividade antioxidante *in vitro* como DPPH e ABTS (CAO *et al.*, 1999; HIRAYAMA *et al.*, 1997; OU *et al.*, 2001; RE *et al.*, 1999; ROBARDS *et al.*, 1999).

Antioxidantes fenólicos, além da propriedade sequestradora de radicais, funcionam também algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias. As substâncias fenólicas e seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir as oxidações lipídicas e níveis séricos de LDL (lipoproteína de baixa densidade); entretanto, poucos substâncias fenólicas são os permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente a sua toxicidade (SOARES, 2002; SILVA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008).

A proteção antioxidante atribuída aos fenólicos pode ser verificada por meio do nível dos biomarcadores, tais como o malondialdeído que é associado com o peroxidação lipídica (NIELSEN *et al.*, 1997), ou 8-oxo-7,8-diidroguanina que indica os danos oxidativos das bases do DNA (CADET *et al.*, 2003).

A capacidade protetora dos fenólicos é devido a um elevado índice de estudos que indicam efeito nas doenças coronárias de coração (CHD) (WEISBURGER, 1999), câncer (DUTHIE *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2001), regulação genética (MYHRSTAD *et al.*, 2002), e doenças neurodegenerativas (SUN *et al.*, 1998).

Trabalhos sobre medicina preventiva mostram que as substâncias fenólicas são os antioxidantes naturais mais eficientes, estimulando a descoberta de novas substâncias que possam ser incluídas na dieta alimentar, visando à manutenção do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante corporal e assim evitando o estresse oxidativo (RICE-EVANS, 1996; MARQUI, 2011).

1.6. Proteômica

O proteoma reflete o estado atual de funcionamento do sistema em condições fisiológicas específicas, ou seja, a expressão funcional do genoma, sendo a ferramenta mais apropriada para se entender o funcionamento dos genes, porque analisa o produto final do genoma (PANDEY e MANN, 2000; EMBRAPA, 2005).

Embora a identificação das proteínas codificada no genoma pareça uma tarefa extremamente difícil de realizar, as informações obtidas por meio de estudos proteômicos são cada vez mais completas (SURESH *et al.*, 2005). Esses novos conhecimentos estão relacionados às vias de sinalização celular, conjuntos de proteínas reguladoras, modificações pós-traducionais, bem como outras sobre os estados fisiológicos e fisiopatológicos de células e organismos.

O estudo do proteoma é importante porque pode levar a três vertentes básicas com implicações diretas em vários campos da biologia e da biotecnologia. Primeiro, a caracterização proteômica pode mostrar caminhos metabólicos nas diversas etapas celulares, gerando um conhecimento sem precedentes na biologia celular. Este conhecimento tornará possível identificar novos alvos farmacológicos específicos, relacionados, por exemplo, a determinada etapa de desenvolvimento de uma célula cancerosa. Segundo, viabiliza a identificação de substâncias bioativas, contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos. Terceiro, permite a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, substâncias endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas substâncias é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (EMBRAPA, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVOS GERAIS

Investigar a atividade de quatro substâncias puras extraídas de *Inga laurina* em linhagem de hepatocarcinoma celular, caracterizar o potencial genotóxico e/ou antigenotóxico e caracterizar proteínas diferencialmente expressas produzidas pela célula quando tratada essas substâncias.

2.2.Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar a citotoxicidade, a partir substâncias puras extraídas da fração acetato de etila obtidas de folhas e caules de *Inga laurina*, após diferentes concentrações pelo ensaio de sulforrodamina B;
- ❖ Avaliar a possível indução da atividade da enzima quinona redutase a partir substâncias fenólicas de *Inga laurina* em diferentes concentrações e tempos de tratamento pelo ensaio de quinona redutase;
- ❖ Caracterizar a atividade genotóxico e antigenotóxico substâncias fenólicas de *Inga laurina* em diferentes concentrações, utilizando o ensaio do cometa;
- ❖ Verificar por análise proteômica proteínas que estão diferencialmente expressas produzidas pelas linhagens celulares após tratamento com substâncias fenólicas de *Inga laurina*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Inga laurina*

Os processos de coleta e extração do material botânico foram realizados pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese, e Ecofisiologia de Produtos Naturais), com a colaboração da Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva e da Dra. Sara de Marqui do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP-Araraquara.

As folhas e caules de *Inga laurina* foram coletados na cidade de Assis em 16 de abril de 2008 e identificados pela Dra. Giselda Durigan. A exsicata (código FEA 3552) foi depositada na Coleção Botânica da Floresta Estadual de Assis.

3.2. Manutenção das linhagens

As células de linhagem Hepa 1c1c7 foram cultivadas em meio de cultura α -MEM (*Alfa Modification of Eagle's Medium* - Sigma) sem ribonucleosídeos ou desoxirribonucleosídeos, acrescido de estreptomicina 0,1mg/mL e penicilina 100 U/mL, bicarbonato de sódio, kanamicina (Sigma), ao pH 7,2 e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil). As células da linhagem HepG2 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma), acrescido de penicilina 100 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL bicarbonato de sódio, kanamicina (Sigma), ao pH 7,2 e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil).

As células foram cultivadas em garrafas, mantidas a 5 % de CO₂ e a temperatura de 37 °C até que a monocamada celular estivesse confluenta.

3.3. Avaliação da citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade por Sulforrodamina B (SRB), foi utilizada uma suspensão de $1,5 \times 10^4$ células/poço da linhagem HepG2. As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades, e após 24 horas de cultivo, foram adicionadas as substâncias puras, seguindo uma diluição seriada 1:3 a partir da concentração de 40 µg/mL.

Após 24 horas do tratamento, foram adicionados 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% à baixa temperatura e as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C, posteriormente a solução de TCA foi removida e as placas foram lavadas, com água corrente de 3 a 4 vezes. Adicionou-se então 50 µL da solução de SRB a 0,4% (diluída em ácido acético) e as placas foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a remoção da SRB, as placas foram lavadas de 3 a 4 vezes com ácido acético a 1%, secas e o corante dissolvido com Tris Base 10 mM (Sigma). Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, as leituras espectrofotométricas da absorbância, foi realizada em comprimento de onda de 570 nm, no leitor de placas iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Os testes foram realizados em três experimentos independentes e a porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG *et al.*, 2004:

$$\text{Células vivas (\%)} = \frac{\text{Absorbância do Teste} \times 100}{\text{Absorbância do Controle Negativo}}$$

Assim após a avaliação das concentrações, foram realizados o ensaio do Cometa

3.4. Ensaio da quinona redutase (QR)

3.4.1. Reagentes

Para realizar a quantificação de indução enzimática com o ensaio de quinona redutase (QR) foi necessário preparar os seguintes reagentes. Solução de lise com 0,8 % de digitonina e 2 mM de EDTA, pH 7,8. Solução de ensaio feita de 25 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM de glicose-6-fosfato, 50 µM de menadiona, 30 µM de NADPH, 5 µM de FAD, 0,07% (m/v) de soro-albumina bovina, 0,03% (m/v) de MTT, 0,01% (v/v) de Tween-20 e 2 unidades/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase.

Como controle positivo foi utilizado o indutor β -naftoflavona (BNF) na concentração de 0,1 μ M (SONG et al., 1999). Reagentes obtidos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

3.4.2. Quantificação da atividade de quinona redutase

As células Hepa1c1c7 foram cultivadas em meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino em placas de 96 cavidades por 24 horas, com cerca de 1×10^4 células/mL em cada poço. Em seguida foram expostas a diferentes concentrações, seguindo uma diluição seriada de 1:2 de uma concentração de 40 μ g/mL, das substâncias de *Inga laurina*, sendo solubilizados em meio de cultura por 48 horas para que ocorresse a possível indução enzimática. Depois do tratamento, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 50 μ L de solução de lise. A placa foi então incubada por 10 minutos a 37 °C. Após a lise, avaliou-se a atividade da QR com a adição de 200 μ L da solução de ensaio. A placa foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz e realizou-se a leitura. A absorbância foi medida usando um leitor de iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 595 nm (PROCHASKA et al., 1988; GROSS et al., 2000; KANG et al., 2004).

Os dados foram normalizados subtraindo da média de absorbância obtida de cada concentração da média de absorbância do controle de reagente branco. O desvio padrão da média de cada tratamento é geralmente menor que 10%. A viabilidade celular foi determinada em uma placa feita paralelamente, corada com violeta cristal, a fim de verificar o comportamento celular, durante o experimento. Então, após 48 h, os tratamentos foram removidos, e as células foram coradas utilizando 100 μ L de solução 0,2 % violeta cristal em 2 % etanol. O corante foi desprezado e a placa foi lavada em água corrente e seca naturalmente. Para leitura espectrofotométrica, o violeta cristal foi solubilizado em 200 μ L de 0,5 % dodecil sulfato de sódio (SDS) em 50 % etanol e mantida a temperatura ambiente no *shaker* para solubilizar o corante completamente, a leitura foi realizada também com absorbância a 595 nm, utilizando leitor de placas iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) (PROCHASKA et al., 1992).

A potência de indução enzimática da QR é expressa em unidades por g (U/g). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram comparados com controle positivo (β -naftoflavona).

3.5. Ensaio do Cometa

3.5.1. Soluções para o ensaio do Cometa

Para a realização do ensaio do cometa foi necessário preparar as seguintes soluções. Solução de lise estoque com 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA e 10 mM de Tris, pH 10. Solução de lise preparada no momento do uso com Triton X-100, DMSO e acrescido de solução lise estoque. Solução de EDTA com 3,7 g em 50 mL de água destilada e solução de NaOH com 100 g em 250 mL de água destilada, o tampão de eletroforese foi feito no momento do uso com 10 mL de EDTA e 60 mL de NaOH em 2 L de água destilada a 4 °C, pH 13. Solução de neutralização com Tris a 0,4 M, a 4 °C, pH 7,5. Solução de PBS (Tampão Fosfato Salino) concentrado 20 vezes com 180 g de NaCl anidro, 27,3 g de Na_2HPO_4 anidro, 4,8 g de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e água destilada, q.s.p. 1 L, pH entre 7,2 e 7,6. Para o ensaio foram utilizadas agarose ponto de fusão normal (Sigma) (1,2 g diluído em 80 mL de PBS 1x, a 37 °C) e agarose de baixo ponto de fusão ou Low melting point LMP (Sigma) (0,05 g diluído em 10 mL de PBS 1x, a 37 °C) para 50 lâminas.

3.5.2. Avaliação de Genotoxicidade

A suspensão celular de $2,5 \times 10^5$ células/poço foi cultivada em placas de 24 cavidades e com um volume final de 500 μL /poço, após 24 horas de cultivo, as células foram tratadas com as substâncias extraídas de *Inga laurina* por 24 horas. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura e como controle positivo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,01 M por 5 minutos.

Após as 24 horas de incubação com os tratamentos, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas, tripsinizadas e reservadas em tubos de 1,5 ml e centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 200 µL de agarose (baixo ponto de fusão) a 37 °C. Em seguida, o volume de cada eppendorf foi transferido para 2 lâminas, previamente tratadas com agarose ponto de fusão normal. Cada lâmina foi recoberta com uma lamínula grande (24 x 60mm) e colocada na geladeira ao abrigo da luz por 5 minutos. Então as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submetidas à solução de lise recém preparada a 4°C por um período mínimo de 12 horas sob refrigeração.

As lâminas foram retiradas da solução de lise e submetidas a uma eletroforese alcalina por 20 minutos. Após, as lâminas foram neutralizadas e fixadas. A leitura das lâminas foi realizada após a coloração em um microscópio de fluorescência. Foram capturadas imagens de 100 nucleóides e analisadas pelo software TriTek CometScore TM versão 1.5. O parâmetro adotado no presente estudo foi a % *DNA in Tail*. (MOLLER, 2005).

3.5.3. Avaliação de Antigenotoxicidade

Para avaliação da antigenotoxicidade das substâncias de *Inga laurina* foram utilizados como agente indutor de danos o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 0.01M em células HepG2. Foram empregados protocolos de pré-tratamento e pós-tratamento, segundo proposto por Scolastici e colaboradores (2008). Esses dois protocolos de tratamento permitiram a identificação da ação antigenotóxica das diferentes concentrações das substâncias proposta para estudo. Para o ensaio de antigenotoxicidade, as células HepG2 foram tratadas com concentrações não citotóxicas.

Pré-tratamento

A suspensão celular de 2,5x10⁵ células/poço foi cultivada em placas de 24 cavidades e com um volume final de 500 µL/poço, após 24 horas de cultivo, as células foram tratadas com as substâncias extraídas de *Inga laurina* por 24 horas.

Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura e como controle positivo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,01 M por 5 minutos.

Após as 24 horas de incubação com os tratamentos, foi adicionado peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,01 M por 5 minutos. Após o período de 5 minutos, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas, “tripsinizadas”, reservadas em tubos de 1,5 ml e centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 200 μ L de agarose (baixo ponto de fusão) a 37 °C. Em seguida, o volume de cada eppendorf foi transferido para 2 lâminas, previamente tratadas com agarose ponto de fusão normal. Cada lâmina foi recoberta com uma lamínula grande (24 x 60mm) e colocada na geladeira ao abrigo da luz por 5 minutos. Então as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submetidas à solução de lise recém prepara a 4°C por um período mínimo de 12 horas sob refrigeração.

As lâminas foram retiradas da solução de lise e submetidas a uma eletroforese alcalina por 20 minutos. Após, as lâminas foram neutralizadas e fixadas. A leitura das lâminas foi realizada após a coloração em um microscópio de fluorescência. Foram capturadas imagens de 100 nucleóides e analisadas pelo software TriTek CometScore TM versão 1.5. O parâmetro adotado no presente estudo foi a % *DNA in Tail*. (MOLLER, 2005).

Pós-tratamento

A suspensão celular de $2,5 \times 10^5$ células/poço foi cultivada em placas de 24 cavidades e com um volume final de 500 μ L/poço, após 24 horas de cultivo, foi induzida a formação de dano celular adicionando-se peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,01 M por 5 minutos. Após esse período as células foram tratadas com as substâncias extraídas de *Inga laurina* por 24 horas. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura e como controle positivo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,01 M por 5 minutos.

Após as 24 horas de incubação com os tratamentos, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas, “tripsinizadas”, reservadas em tubos de 1,5 ml e centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 200 μ L de agarose (baixo ponto de

fusão) a 37 °C. Em seguida, o volume de cada eppendorf foi transferido para 2 lâminas, previamente tratadas com agarose ponto de fusão normal. Cada lâmina foi recoberta com uma lamínula grande (24 x 60mm) e colocada na geladeira ao abrigo da luz por 5 minutos. Então as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submetidas à solução de lise recém prepara a 4°C por um período mínimo de 12 horas sob refrigeração.

As lâminas foram retiradas da solução de lise e submetidas a uma eletroforese alcalina por 20 minutos. Após, as lâminas foram neutralizadas e fixadas. A leitura das lâminas foi realizada após a coloração em um microscópio de fluorescência. Foram capturadas imagens de 100 nucleóides e analisadas pelo software TriTek CometScore TM versão 1.5. O parâmetro adotado no presente estudo foi a % *DNA in Tail*. (MOLLER, 2005).

3.6. Análise Proteômica

A fim de determinar o perfil proteico foram utilizadas células tratadas e não tratadas com as substâncias fenólicas de *I. laurina*.

Esses ensaios foram realizados no Laboratório do Hemocentro de Ribeirão Preto, sob a coordenação do Prof. Dr. José Cesar Rosa coordenador do Centro de Química de Proteínas e professor doutor do departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, segundo protocolo abaixo:

3.6.1. Extração e Quantificação de Proteínas das Linhagens Celulares

As proteínas foram extraídas com a seguinte solução de lise: uréia 7,7 M, tiouréia 2,2 M, CHAPS 4,4 % e os inibidores de protease (coquetel de inibidores, 1 µL para 1×10^6 células, PMSF 1 mM) e inibidores de fosfatases (ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 1 mM, β-glicerofosfato de sódio 1 mM e pirofosfato de sódio 10mM). Para cada 1×10^7 células foram adicionadas 100 µL de solução de lise. As células foram rompidas por 3 ciclos de: a) banho de ultrassom durante 5 min, b) banho de gelo e agitação em vórtex por 5 min; após o terceiro ciclo, as amostras foram congeladas e descongeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, o extrato

total foi centrifugado a 20.000 g por 30 minutos para precipitação dos restos celulares e o sobrenadante foi submetido à determinação da quantidade de proteínas e armazenado a -80°C.

A quantificação de proteínas em solução foi realizada pelo método de Bradford (1976) em microplaca, como descrito a seguir. As amostras, diluídas apropriadamente em água Milli-Q, foram pipetadas num volume final de 20 µL. A seguir, foram adicionados 200µL de reagente de reagente de Bradford (Coomassie Blue G 0,05% em etanol 25% v/v e ácido fosfórico 50% v/v). Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lida em 595 nm em leitor de ELISA. A quantificação foi realizada utilizando como referência uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA).

3.6.2. Preparação do Extrato Protéico para *Shotgun Proteomics* e Marcação Isobárica com Itraq

O extrato protéico foi reduzido e alquilado para posterior digestão com tripsina. Brevemente: a 1 mg do extrato protéico foi adicionados 1 µL de redutor e a mistura foi incubada por 30 min; em seguida, foi adicionados 2 µL de reagente bloqueador e a mistura foi mantida por 1 hora ao abrigo da luz, seguindo o protocolo do fabricante (Applied Biosystem, Foster City, CA).

3.6.3. Digestão com tripsina

A amostra reduzida e alquilada foi diluída 4 vezes com TEAB 1 M (para concentração final de 100 mM), pH 8,0. Massas apropriadas de tripsina (Sequencing grade modified Trypsin, Promega) diluída em TEAB 0.1 M foram adicionadas e a reação de hidrólise mantida por 24 horas a 37 °C.

3.6.4. Marcação das amostras com isóbaros iTRAQ

Os extratos protéicos digeridos com tripsina foram marcados com diferentes reagentes isobáricos (iTRAQ). Para cada amostra um isóbaro foi utilizado (existem 8 isóbaros diferentes comercialmente disponíveis) e, após a marcação, elas foram agrupadas em uma única amostra para a análise por cromatografia líquida bidimensional (troca-iônica e fase reversa) “on-line” ou “off-line” com espectrômetro de massas. Os íons marcados, quando submetidos à fragmentação (CID-MS/MS), produzirão íons específicos (íons repórteres) de baixa massa, possibilitando a quantificação relativa da proteína identificada para cada amostra da mistura. As intensidades dos íons repórteres foram extraídas de arquivo exportável ASCII produzido por ambos os espectrômetros de massas e exportados para planilhas de Excel (Microsoft Office-2003) para posterior manipulação estatística.

3.6.5. Cromatografia em Coluna de Troca Iônica (Scx)

Após a formação do pool de amostras rotuladas por iTRAQ, as amostras foram centrifugadas e aplicadas em sistema de HPLC com coluna de troca iônica PolyLC (Polysulfoethyl A) desenvolvido em um gradiente linear dos solvente A: 10mM KH₂PO₄/20% AcN pH 2,7-3,0 e solvente B: 10mM KH₂PO₄/0,5M NaCl/20% AcN pH 2,7-3,0 e fluxo de 1mL/min, foram coletadas frações de 1mL. As frações SCX foram dessalificadas e separadas em HPLC com uma micro coluna (50mm×4,0mm d.i.) empacotada com resina de fase reversa C18 Vydac (238TBPB) e foram analisadas off-line por MALDI-TOF/TOF-MS.

3.7. Espectrometria de Massas

3.7.1. MALDI-ToF-ToF

As amostras foram também aplicadas a um nano-UFLC com coluna capilar monolítica de fase reversa e o efluente foi coletado automaticamente em placa de MALDI, utilizando o equipamento AccuSpot. Posteriormente, a cada spot foi adicionada a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (5mg/mL em 0,1% TFA/50%

ACN) para ser analisado em espectrômetro de massas MALDI-ToF-ToF (Axima Performance, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK), com aquisição automática dos espectros MS e MS/MS para os íons mais abundantes. A identificação das proteínas foi realizada pelo programa MASCOT (www.matrixscience.com).

3.7.2. Identificação das proteínas utilizando o “Software” Mascot

Os espectros obtidos foram processados e submetidos a um banco de dados para identificação das proteínas. Para isto, foi utilizado o programa Mascot versão 2.2.04, banco de dados SwissProt, taxonomia *Homo sapiens* (human), tendo como parâmetros: enzima a tripsina com perda de 1 clivagem (“missed cleavage”), modificação fixa para Methionil-cys e modificações variáveis para oxidação de Metionina. Também foram adicionados como modificações variáveis a incorporação de isóbaros de iTRAQ. Para excluir identificações falso positivas (FDR) os espectros de massas foram submetidos ao banco de dados no modo reverso, nível de significância estatística de $p < 0.05$ que corresponde a um erro permitido de 5%, um escore para peptídeos > 35 , que corresponde a íons da série y ou b consecutivos para o seqüenciamento dos aminoácidos dos peptídeos por CID-MS/MS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação das substâncias isoladas da fração acetato de etila obtidas de folhas e caules de *Inga laurina*

5.1.1 Ensaio de citotoxicidade

Os resultados de citotoxicidade estão apresentados na tabela 1. Todas as substâncias apresentaram entre 85 a 97 % de células vivas. As substâncias não apresentam diferença estatística significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$)

Tabela 1: Determinação da viabilidade celular das substâncias puras isoladas das folhas e ramos *I. laurina*, em linhagem de células HepG2, por meio da técnica de SRB.

Viabilidade Celular (%) $\pm$ EP				
	CP	24,81 $\pm$ 2,57***		
	CN	58,33 $\pm$ 7,78		
Concentração (μ g/mL)	Substância 5-3	Subst. 5-5	Subst. 5-6	Subst. 5-7
40	51,90 $\pm$ 6,29	58,09 $\pm$ 8,14	56,96 $\pm$ 8,27	58,36 $\pm$ 6,95
13,3	67,38 $\pm$ 7,70	70,20 $\pm$ 10,00	63,21 $\pm$ 7,99	70,92 $\pm$ 8,14
4,4	65,13 $\pm$ 8,46	68,81 $\pm$ 9,29	68,22 $\pm$ 10,55	70,46 $\pm$ 8,84
1,5	66,97 $\pm$ 8,85	69,13 $\pm$ 7,96	67,65 $\pm$ 9,02	70,77 $\pm$ 9,63
0,5	66,96 $\pm$ 8,62	71,26 $\pm$ 8,56	68,01 $\pm$ 10,19	70,36 $\pm$ 7,93

Viabilidade celular é dada em porcentagem, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro-padrão-EP). CP: controle positivo. CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

5.2.2 Atividade de Indução de quinona redutase

As substâncias puras de *I. laurina* não apresentaram indução de quinona redutase (médias acima de 2,0). Na análise da viabilidade celular não houve significância estatística em nenhuma das concentrações quando comparadas ao controle de veículo. (Tabelas de 2 a 5).

Tabela 2: Atividade da enzima quinona redutase através da substância 5-3 extraída de *Inga laurina* em linhagem de células Hepa1c1c7.

Concentração	IR (tratamento/controle)	Viabilidade celular (%)
0,5	0,9 ± 0,47	132,6 ± 22,08
1,5	0,5 ± 0,49	130,5 ± 34,45
4,4	0,7 ± 0,2	117,8 ± 11,80
13,3	0,4 ± 0,39	102,3 ± 13,45
40	1,3 ± 0,56	115,1 ± 27,24
β-naftoflavona	2,0 ± 0,14	119,5 ± 28,23
CB	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CV	0,75 ± 0,00	100 ± 0,00

IR, taxa de indução de QR, relação entre a atividade específica da QR em células tratadas com composto e controle de veículo. β-naftoflavona foi adotada como controle positivo. CB: controle branco. CV: controle de veículo (DMSO 1%). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. IR comparado βNF e viabilidade com CV. Análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 3: Atividade da enzima quinona redutase através da substância 5-5 extraída de *Inga laurina* em linhagem de células Hepa1c1c7.

Concentração	IR (tratamento/controle)	Viabilidade celular (%)
0,5	0,6 ± 0,28	118,8 ± 11,86
1,5	0,7 ± 0,23	115,0 ± 9,76
4,4	1,1 ± 0,35	112,7 ± 23,08
13,3	1,4 ± 0,94	79,2 ± 8,32
40	1,5 ± 0,95	67,4 ± 12,25
β-naftoflavona	2,0 ± 0,14	119,5 ± 28,23
CB	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CV	0,75 ± 0,00	100 ± 0,00

IR, taxa de indução de QR, relação entre a atividade específica da QR em células tratadas com composto e controle de veículo. β-naftoflavona foi adotada como controle positivo. CB: controle branco. CV: controle de veículo (DMSO 1%). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. IR comparado βNF e viabilidade com CV. Análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 4: Atividade da enzima quinona redutase através da substância 5-6 extraída de *Inga laurina* em linhagem de células Hepa1c1c7.

Concentração	IR (tratamento/controle)	Viabilidade celular (%)
0,5	1,1 ± 0,31	98,1 ± 13,75
1,5	0,7 ± 0,08	103,2 ± 10,53
4,4	0,9 ± 0,31	104,9 ± 9,63
13,3	1,1 ± 0,41	104,2 ± 12,27
40	1,1 ± 0,33	97,4 ± 7,96
β-naftoflavona	2,0 ± 0,14	119,5 ± 28,23
CB	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CV	0,75 ± 0,00	100 ± 0,00

IR, taxa de indução de QR, relação entre a atividade específica da QR em células tratadas com composto e controle de veículo. β-naftoflavona foi adotada como controle positivo. CB: controle branco. CV: controle de veículo (DMSO 1%). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. IR comparado βNF e viabilidade com CV. Análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 5: Atividade da enzima quinona redutase através da substância 5-7 extraída de *Inga laurina* em linhagem de células Hepa1c1c7.

Concentração	IR (tratamento/controle)	Viabilidade celular (%)
0,5	0,7 ± 0,29	155,7 ± 37,36
1,5	0,7 ± 0,33	114,6 ± 22,37
4,4	0,6 ± 0,33	110,9 ± 17,17
13,3	0,7 ± 0,24	183,0 ± 86,88
40	0,9 ± 0,57	88,7 ± 12,86
β-naftoflavona	2,0 ± 0,14	119,5 ± 28,23
CB	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CV	0,75 ± 0,00	100 ± 0,00

IR, taxa de indução de QR, relação entre a atividade específica da QR em células tratadas com composto e controle de veículo. β-naftoflavona foi adotada como controle positivo. CB: controle branco. CV: controle de veículo (DMSO 1%). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. IR comparado βNF e viabilidade com CV. Análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

5.2.3 Avaliação da Genotoxicidade

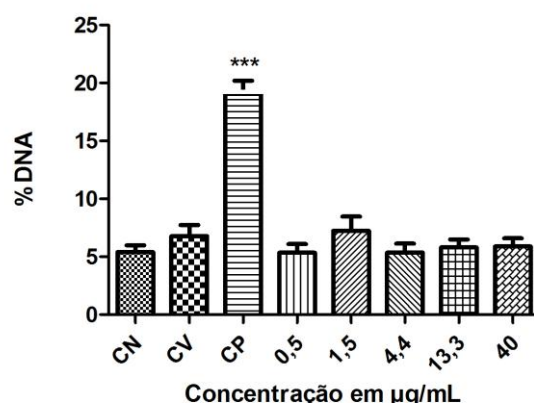
A avaliação da genotoxicidade foi realizada em linhagem HepG2 e as concentrações utilizadas no ensaio deveriam ser pré-estabelecidas de acordo com o ensaio de quinona redutase, entretanto, nos ensaios, não foi observado indução da enzima quinona redutase, portanto, utilizou-se das concentrações testadas no ensaio de Sulforrodamina B. O parâmetro adotado no presente estudo foi a % DNA.

O tratamento da linhagem celular HepG2 com a substância 5-3 (tabela 6) e com a substância 5-7 (tabela 9) de *I. laurina* demonstrou que não houve genotoxicidade em nenhuma das concentrações dessas substâncias, não apresentando diferença estatística quando comparada os grupos teste com o controle negativo. A substância 5-5 (tabela 7) embora tenha uma diferença estatística na concentração de 0,5 µg/mL ($2,55 \pm 0,46$) quando comparado ao controle negativo não é genotóxica, pois o valor da porcentagem de DNA está menor que o valor do controle negativo. As concentrações de 1,5 á 40µg/mL, não apresentaram genotoxicidade, não apresentando diferença estatística obtida quando comparada os grupos teste com o controle negativo.

A substância 5-6 (Tabela 8) na concentração de 0,5 µg/mL ($1,83 \pm 0,3$) até a concentração de 4,4 µg/mL ($1,98 \pm 0,34$) $p < 0,001$ apresentou-se estatisticamente diferente do controle negativo, no entanto os valores apresentados da porcentagem de DNA são menores que o controle negativo, não sendo, portanto genotóxica. As concentrações de 13,3 e 40µg/mL, $5,28 \pm 0,91$ e $5,97 \pm 0,8$, respectivamente, não apresentaram genotoxicidade, não apresentando diferença estatística obtida quando comparada os grupos teste com o controle negativo.

Tabela 6: Avaliação da genotoxicidade da Substância 5-3 de *Inga laurina*.

	% DNA $\pm$ EP
CN	$5,41 \pm 0,58$
CP	$19,07 \pm 1,13^{***}$
Substância 5-3 (µg/mL)	
0,5	$5,35 \pm 0,74$
1,5	$7,24 \pm 1,22$
4,4	$5,36 \pm 0,78$
13,3	$5,8 \pm 0,69$
40	$5,88 \pm 0,74$

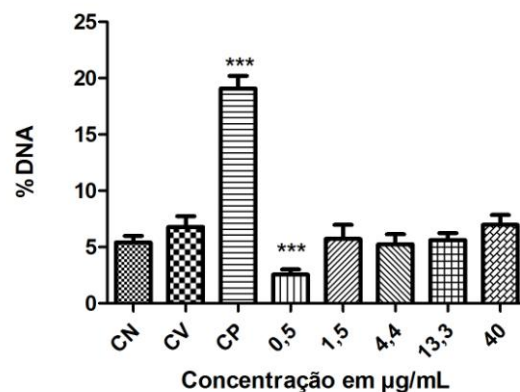


CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

Tabela 7: Avaliação da genotoxicidade Substância 5-5 de *Inga laurina*.

	% DNA $\pm$ EP
CN	5,41 $\pm$ 0,58
CP	19,07 $\pm$ 1,13***
Substância 5-5 (μ g/mL)	
0,5	2,55 $\pm$ 0,46***
1,5	5,73 $\pm$ 1,23
4,4	5,23 $\pm$ 0,91
13,3	5,62 $\pm$ 0,62
40	6,97 $\pm$ 0,87

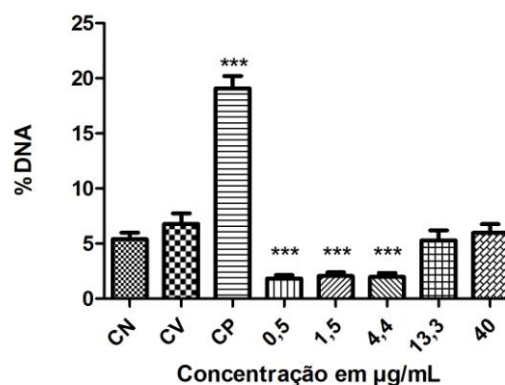
Genotoxicidade *Inga laurina* Substância 5-5



CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

Tabela 8: Avaliação da genotoxicidade da Substância 5-6 de *Inga laurina*.

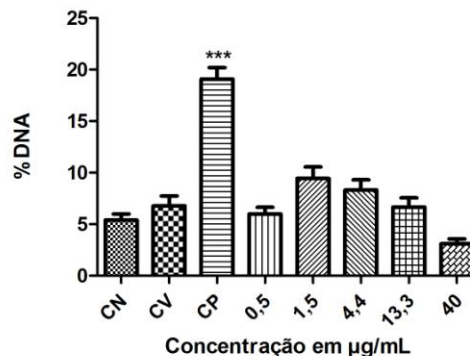
	% DNA $\pm$ EP
CN	5,41 $\pm$ 0,58
CP	19,07 $\pm$ 1,13***
Substância 5-6 (μ g/mL)	
0,5	1,83 $\pm$ 0,3***
1,5	2,05 $\pm$ 0,35***
4,4	1,98 $\pm$ 0,34***
13,3	5,28 $\pm$ 0,91
40	5,97 $\pm$ 0,8



CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) $p < 0,001$

Tabela 9: Avaliação da genotoxicidade da Substância 5-7 de *Inga laurina*.

	% DNA $\pm$ EP
CN	5,41 $\pm$ 0,58
CP	19,07 $\pm$ 1,13***
Substância 5-7 ($\mu\text{g/mL}$)	
0,5	5,98 $\pm$ 0,65
1,5	9,45 $\pm$ 1,1
4,4	8,32 $\pm$ 1,0
13,3	6,66 $\pm$ 0,89
40	3,1 $\pm$ 0,47



CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) $p < 0,001$

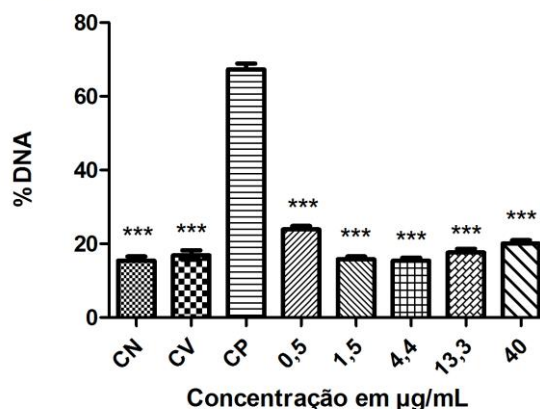
5.2.4 Avaliação da Antigenotoxicidade (Pré tratamento)

A avaliação da antigenotoxicidade foi realizada em linhagem HepG2 e as concentrações utilizadas no ensaio foram as mesmas testadas no ensaio de genotoxicidade. Neste ensaio, as células foram tratadas com as substâncias isoladas de *Inga laurina*, e em seguida, expostas a peróxido de hidrogênio. Foi então realizado o ensaio do cometa para analisar se o pré-tratamento com as substâncias isoladas de *Inga laurina* foram capazes de proteger a célula do dano genotóxico do peróxido de hidrogênio. As células tratadas com as substâncias e peróxido de hidrogênio são comparadas com o controle positivo, tratado somente com peróxido de hidrogênio.

É demonstrado nas tabelas 10, 11 e 12 que as substâncias 5-3; 5-5 e 5-6 apresentaram um forte efeito protetor com o valor de p menor que 0,001 em todas as concentrações testadas. Na tabela 13 é demonstrado que a substância 5-7 também mostrou efeito protetor à exposição ao peróxido de hidrogênio, porém nas concentrações de 0,5 e 40 $\mu\text{g/mL}$ o valor de p foi de 0,01, e na concentração de 13,3 $\mu\text{g/mL}$ o valor de p foi de 0,05.

Tabela 10: Avaliação da antigenotoxicidade pré-tratamento com H₂O₂ da Substância 5-3 de *Inga laurina*.

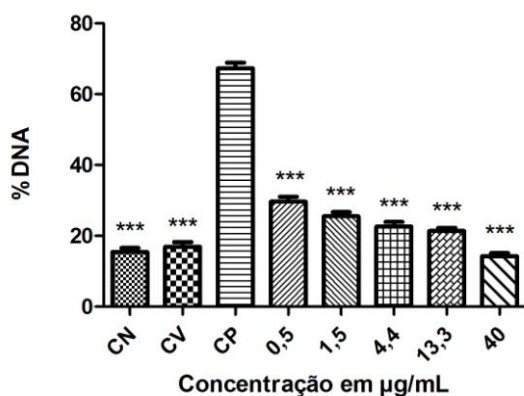
	% DNA $\pm$ EP
CN	15,41 $\pm$ 1,16***
CP	67,33 $\pm$ 0,95
Substância 5-3 (μ g/mL)	
0,5	23,88 $\pm$ 0,97***
1,5	15,80 $\pm$ 0,77***
4,4	15,44 $\pm$ 0,79***
13,3	17,66 $\pm$ 0,96***
40	20,08 $\pm$ 0,90***



CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

Tabela 11: Avaliação da antigenotoxicidade pré-tratamento com H₂O₂ Substância 5-5 de *Inga laurina*.

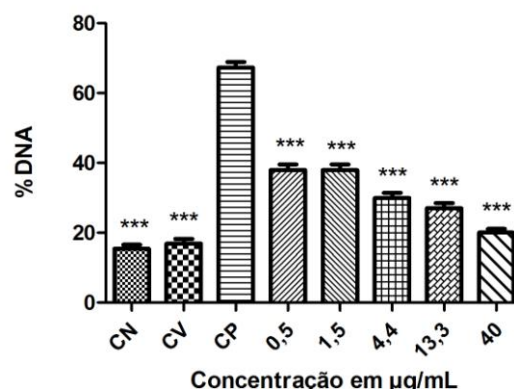
	% DNA $\pm$ EP
CN	15,41 $\pm$ 1,16***
CP	67,33 $\pm$ 0,95
Substância 5-5 (μ g/mL)	
0,5	29,64 $\pm$ 1,40***
1,5	25,53 $\pm$ 1,16***
4,4	22,66 $\pm$ 1,25***
13,3	21,39 $\pm$ 0,85***
40	14,26 $\pm$ 0,81***



CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

Tabela 12: Avaliação da antigenotoxicidade pré-tratamento com H₂O₂ da Substância 5-6 de *Inga laurina*.

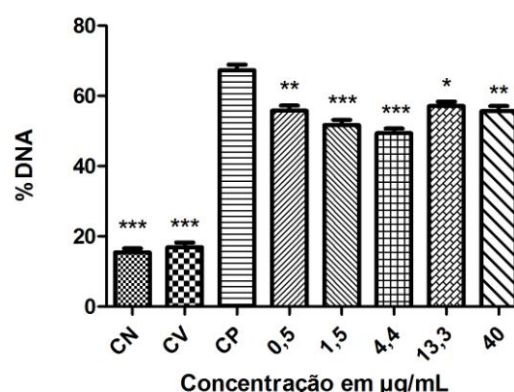
	% DNA $\pm$ EP
CN	15,41 $\pm$ 1,16***
CP	67,33 $\pm$ 0,95
Substância 5-6 (μ g/mL)	
0,5	37,99 $\pm$ 1,55***
1,5	37,99 $\pm$ 1,55***
4,4	30,00 $\pm$ 1,41***
13,3	27,02 $\pm$ 1,46***
40	20,06 $\pm$ 1,03***



CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) $p < 0,001$

Tabela 13: Avaliação da antigenotoxicidade pré-tratamento com H₂O₂ da Substância 5-7 de *Inga laurina*.

	% DNA $\pm$ EP
CN	15,41 $\pm$ 1,16***
CP	67,33 $\pm$ 0,95
Substância 5-7 (μ g/mL)	
0,5	55,76 $\pm$ 1,49**
1,5	51,70 $\pm$ 1,46***
4,4	49,37 $\pm$ 1,31***
13,3	57,09 $\pm$ 1,29*
40	55,64 $\pm$ 1,48**



CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) $p < 0,001$

5.2.5 Avaliação da Antigenotoxicidade (Pós-tratamento)

A avaliação do pós-tratamento foi realizada em linhagem HepG2 e as concentrações utilizadas no ensaio foram as mesmas testadas no ensaio anterior.

O tratamento da linhagem celular HepG2 com a substância 5-3 (tabela 14) após o dano com peróxido de hidrogênio apresentou diferença estatística nas

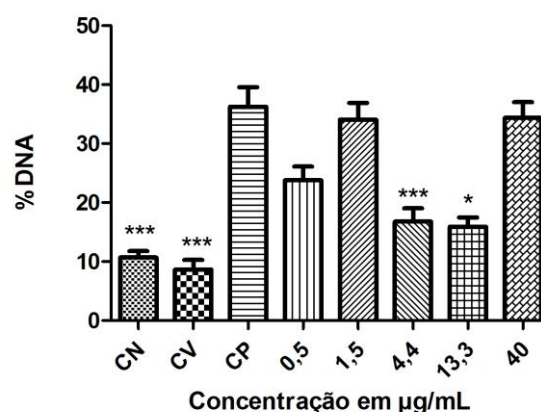
concentrações de 4,4µg/mL e 13,3 µg/mL correspondendo as médias $16,78 \pm 22,36$ e $15,9 \pm 15,66$, onde na concentração de 4,4µg/mL o valor de p foi menor que 0,001.

A substância 5-5 de *I. laurina* apresentou diferença significativa nas concentrações de 1,5 µg/mL, 4,4 µg/mL e 13,3, sendo respectivamente $18,48 \pm 27,61$, $10,84 \pm 14,43$ e $12,23 \pm 17,9$ com valor de significância menor que 0,001 nas três concentrações (tabela 15).

Tabela 14: Avaliação da antigenotoxicidade pós-tratamento com H₂O₂ da Substância 5-3 de *Inga laurina*.

	% DNA $\pm$ EP
CN	$10,71 \pm 1,05^{***}$
CP	$36,21 \pm 3,33$
Substância 5-3 (µg/mL)	
0,5	$23,79 \pm 2,30$
1,5	$34,04 \pm 2,86$
4,4	$16,78 \pm 2,24^{***}$
13,3	$15,9 \pm 1,57^*$
40	$34,34 \pm 2,67$

Antigenotoxicidade *Inga laurina* Substância 5-3

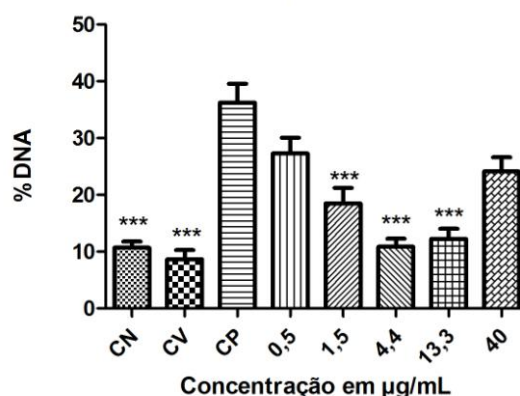


CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

Tabela 15: Avaliação da antigenotoxicidade pós-tratamento com H₂O₂ Substância 5-5 de *Inga laurina*.

	% DNA $\pm$ EP
CN	$10,71 \pm 1,05^{***}$
CP	$36,21 \pm 3,33$
Substância 5-5 (µg/mL)	
0,5	$27,28 \pm 2,78$
1,5	$18,48 \pm 2,76^{***}$
4,4	$10,84 \pm 1,44^{***}$
13,3	$12,23 \pm 1,79^{***}$
40	$24,13 \pm 2,51$

Antigenotoxicidade *Inga laurina* Substância 5-5



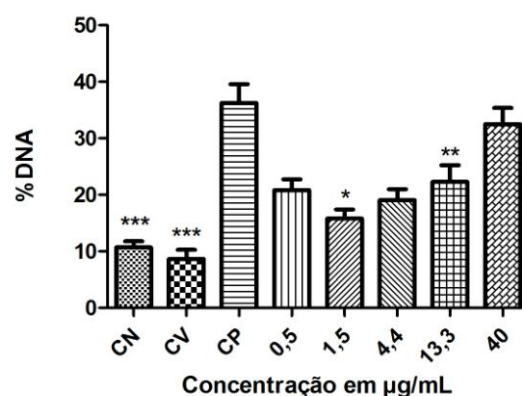
CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) $p < 0,001$

A substância 5-6 de *I. laurina* apresentou diferença significativa somente nas concentrações de 1,5 µg/mL e 13,3 µg/mL, sendo respectivamente $15,77 \pm 16,34$ e $22,25 \pm 29,72$ com valor de significância menor que 0,01 para a concentração de 13,3 µg/mL e menor que 0,05 para a concentração de 1,5 µg/mL (tabela 16).

Tabela 16: Avaliação da antigenotoxicidade pós-tratamento com H₂O₂ da Substância 5-6 de *Inga laurina*.

	% DNA $\pm$ EP
CN	$10,71 \pm 1,05^{***}$
CP	$36,21 \pm 3,33$
Substância 5-6 (µg/mL)	
0,5	$20,82 \pm 1,89$
1,5	$15,77 \pm 1,63^*$
4,4	$19,06 \pm 1,92$
13,3	$22,25 \pm 2,97^{**}$
40	$32,46 \pm 2,90$

Antigenotoxicidade *Inga laurina* Substância 5-6



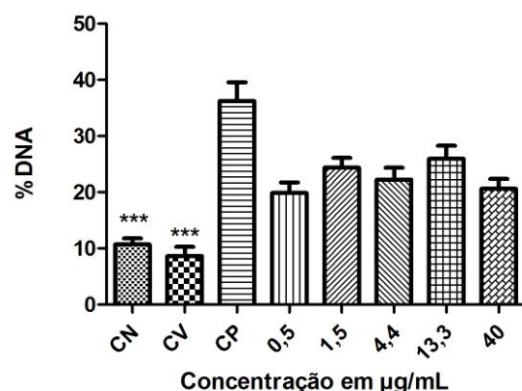
CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) $p < 0,001$

A substância 5-7 de *I. laurina* não apresentou diferença significativa em nenhuma das concentrações testadas. As médias da porcentagem de DNA variaram de 25,95 a 19,87, sendo menores que o controle positivo (tabela 17).

Tabela 17: Avaliação da antigenotoxicidade pós-tratamento com H₂O₂ da Substância 5-7 de *Inga laurina*.

	% DNA $\pm$ EP
CN	$10,71 \pm 1,05^{***}$
CP	$36,21 \pm 3,33$
Substância 5-7 (µg/mL)	
0,5	$19,87 \pm 1,88$
1,5	$24,34 \pm 1,74$
4,4	$22,25 \pm 2,11$
13,3	$25,95 \pm 2,31$
40	$20,59 \pm 1,77$

Antigenotoxicidade *Inga laurina* Substância 5-7



CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da % DNA $\pm$ erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) $p < 0,001$

O câncer representa um problema de saúde pública, sendo a terceira maior causa de morte no mundo (OMS, 2008). A etiologia do câncer pode ser interna ou externa. As causas internas são geneticamente pré-determinadas, onde mutações provocadas por fatores como sistema imunológico ou fatores hormonais causam ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor que alteram a sua função original (ALBERTS et al., 1999; BLUME-JENSEN & HUNTER, 2001). Fatores ambientais como poluentes, infecções, tabagismo, alcoolismo, uso de drogas e medicamentos, exposição à radiação, hábitos alimentares, entre outros, constituem as causas externas para o aparecimento do câncer (OLIVEIRA et al., 2007). Cerca de 70% a 80% dos casos de câncer são de origem externa, portanto podemos considerá-los passíveis de prevenção (GREENWALD et al. 1995; ALBERTS et al., 1999; PEZZUTO ET al., 2005), com mudanças no estilo de vida e o uso da quimioprevenção.

Os dados obtidos mostram que não há citotoxicidade e genotoxicidade das substâncias 5-3; 5-5; 5-6 e 5-7 de *Inga laurina* com 24 horas de tratamento. Além disso, o pré-tratamento com cada uma das substâncias isoladas, em todas as concentrações, protegeu células HepG2 do dano causado pelo peróxido de hidrogênio. O pós-tratamento com as substâncias isoladas, em algumas concentrações, diminuiu os efeitos genotóxicos do peróxido de hidrogênio. Embora nenhuma das substâncias são capazes de induzir a enzima quinona redutase nas concentrações testadas, os dados de antigenotoxicidade mostram uma poderosa ação quimioprotetora.

5.3 Análise Proteômica

A concentração de tratamento das células para o ensaio de proteômica foi baseado no experimento de antigenotoxicidade. Foram avaliadas somente as substâncias 5-3, 5-5 e 5-6, pois somente essas apresentaram reparo contra o dano produzido pelo Peróxido de hidrogênio. As concentrações testadas foram 4,4 µg/mL para a substância 5-3, 4,4 µg/mL para a substância 5-5 e 13,3 µg/mL para a substância 5-6.

Foram identificadas 85 proteínas com score ≥ 30 para as três substâncias puras. Das 85 proteínas encontradas, foram separadas por tratamento e agrupadas por aumento ou diminuição da razão entre o tratamento e o controle, onde $\geq 1,5$ significa que no tratamento a proteína encontra-se aumentada em relação ao controle e valores $\leq 0,5$ significa que no tratamento a proteína encontra-se diminuída em relação ao controle. Valores iguais a 1 representa proteínas com a mesma expressão tanto no controle, quanto no tratamento.

No tratamento com a substância 5-3 foram selecionadas as 18 proteínas sendo que 13 apresentam um aumento da expressão e 5 apresentaram uma diminuição da expressão quando comparadas com o controle (Tabela 18).

Tabela 18: Identificação das proteínas detectadas a partir de células HepG2 tratadas com a substância 5-3 com score ≥ 30 .

Prot Acc	Proteína	Score	115/114
FLNA_HUMAN	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4	48	0,00
ERO1A_HUMAN	ERO1-like protein alpha OS=Homo sapiens GN=ERO1L PE=1 SV=2	36	0,00
H4_HUMAN	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	36	0,00
PROF1_HUMAN	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	48	0,29
ALDR_HUMAN	Aldose reductase OS=Homo sapiens GN=AKR1B1 PE=1 SV=3	65	0,50
GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	47	1,50
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=4	82	1,50
UGDH_HUMAN	UDP-glucose 6-dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=UGDH PE=1 SV=1	223	1,53
VIME_HUMAN	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4	278	1,53
ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1	61	1,56
TERA_HUMAN	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4	86	1,59
GFAP_HUMAN	Glial fibrillary acidic protein OS=Homo sapiens GN=GFAP PE=1 SV=1	46	1,66
PSD7_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens GN=PSMD7 PE=1 SV=2	43	1,70
NPM_HUMAN	Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	130	1,74
SYWC_HUMAN	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=WARS PE=1 SV=2	144	1,79
MYOF_HUMAN	Myoferlin OS=Homo sapiens GN=MYOF PE=1 SV=1	61	1,85
TYPH_HUMAN	Thymidine phosphorylase OS=Homo sapiens GN=TYMP PE=1 SV=2	59	1,96
NQO1_HUMAN	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 OS=Homo sapiens GN=NQO1 PE=1 SV=1	45	2,29

Para a substância 5-5, também foram selecionadas 18 proteínas, sendo que somente 4 apresentaram um aumento da expressão e 14 apresentaram uma diminuição da expressão (Tabela 19).

Tabela 19: Identificação das proteínas detectadas a partir de células HepG2 tratadas com a substância 5-5 com score ≥ 30 .

Prot Acc	Proteína	Score	116/114
K6PP_HUMAN	6-phosphofructokinase type C OS=Homo sapiens GN=PFKP PE=1 SV=2	208	0,00
CH60_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	141	0,00
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=4	82	0,00
CYB5B_HUMAN	Cytochrome b5 type B OS=Homo sapiens GN=CYB5B PE=1 SV=2	44	0,00
QCR6_HUMAN	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRH PE=1 SV=2	38	0,00
ST1A3_HUMAN	Sulfotransferase 1A3/1A4 OS=Homo sapiens GN=SULT1A3 PE=1 SV=1	37	0,00
NQO1_HUMAN	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 OS=Homo sapiens GN=NQO1 PE=1 SV=1	45	0,20
ALDR_HUMAN	Aldose reductase OS=Homo sapiens GN=AKR1B1 PE=1 SV=3	65	0,22
ERO1A_HUMAN	ERO1-like protein alpha OS=Homo sapiens GN=ERO1L PE=1 SV=2	36	0,27
CHSP1_HUMAN	Calcium-regulated heat stable protein 1 OS=Homo sapiens GN=CARHSP1 PE=1 SV=2	60	0,28
ANXA2_HUMAN	Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2	185	0,45
TERA_HUMAN	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4	86	0,48
FLNA_HUMAN	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4	48	0,49
PROF1_HUMAN	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	48	0,49
PSA7_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-7 OS=Homo sapiens GN=PSMA7 PE=1 SV=1	54	1,66
VIME_HUMAN	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4	278	1,68
GFAP_HUMAN	Glial fibrillary acidic protein OS=Homo sapiens GN=GFAP PE=1 SV=1	46	1,71
PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3	42	1,79

Para a substância 5-6, foram selecionados 15 proteínas, das quais 3 apresentaram um aumento na expressão e 12 uma diminuição da expressão (Tabela 20).

Tabela 20: Identificação das proteínas detectadas a partir de células HepG2 tratadas com a substância 5-6 com score ≥ 30 .

Prot Acc	Proteína	Score	117/114
TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 PE=1 SV=3	105	0,00
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=4	82	0,00
TYPH_HUMAN	Thymidine phosphorylase OS=Homo sapiens GN=TYMP PE=1 SV=2	59	0,00
PSA7_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-7 OS=Homo sapiens GN=PSMA7 PE=1 SV=1	54	0,00
H4_HUMAN	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	36	0,00
FLNA_HUMAN	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4	48	0,09
PROF1_HUMAN	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	48	0,20
MVP_HUMAN	Major vault protein OS=Homo sapiens GN=MVP PE=1 SV=4	80	0,36
CHSP1_HUMAN	Calcium-regulated heat stable protein 1 OS=Homo sapiens GN=CARHSP1 PE=1 SV=2	60	0,39
PYGB_HUMAN	Glycogen phosphorylase, brain form OS=Homo sapiens GN=PYGB PE=1 SV=5	39	0,43
TBB3_HUMAN	Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB3 PE=1 SV=2	160	0,45
BLVRB_HUMAN	Flavin reductase (NADPH) OS=Homo sapiens GN=BLVRB PE=1 SV=3	85	0,50
CYB5B_HUMAN	Cytochrome b5 type B OS=Homo sapiens GN=CYB5B PE=1 SV=2	44	1,65
ERO1A_HUMAN	ERO1-like protein alpha OS=Homo sapiens GN=ERO1L PE=1 SV=2	36	1,72
MYOF_HUMAN	Myoferlin OS=Homo sapiens GN=MYOF PE=1 SV=1	61	1,86

As proteínas identificadas nos 3 tratamentos foram analisadas de forma agrupada, e com isso foi possível observar que das 31 proteínas identificadas, somente 9 estavam diretamente relacionadas ao estresse oxidativo ou resposta a danos no DNA (figura 2).

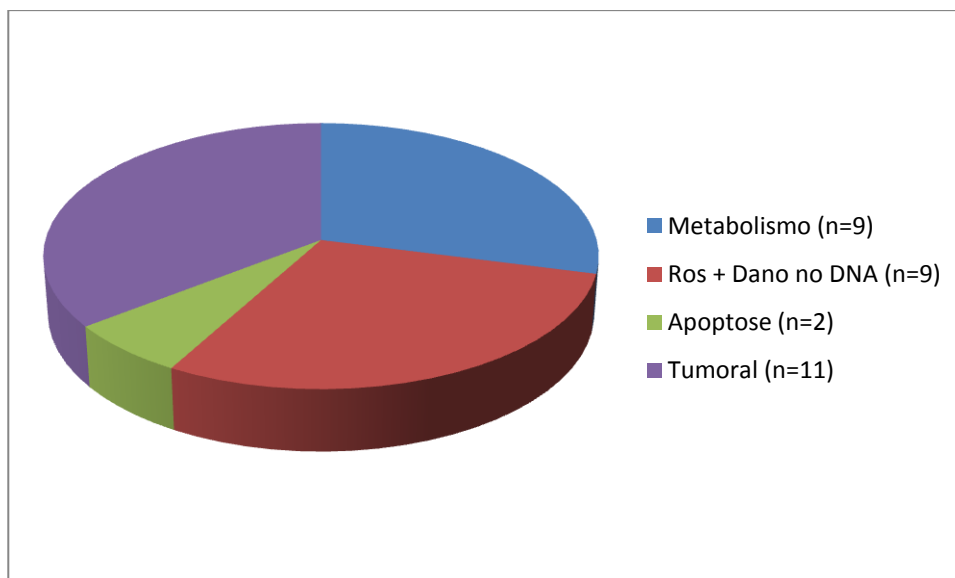


Figura 2. Distribuição das proteínas diferencialmente expressas da linhagem celular HEPG2 por categoria funcional, sequenciadas por MALDI-TOF/TOF e identificadas pelo software Mascot.

O acúmulo de danos no genoma está relacionado com o aumento da incidência do câncer. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas a partir de fontes endógenas, principalmente do metabolismo oxidativo nas mitocôndrias, e de fontes exógenas, como a radiação ionizante. ROS ataca prontamente a molécula de DNA, gerando uma variedade de lesões, tais como bases oxidadas e quebras dos filamentos. Se não for removido adequadamente, dano no DNA pode ser potencialmente devastador para a fisiologia celular normal, levando a metagênese e/ou a morte das células, especialmente no caso de lesões citotóxicas que bloqueiam a progressão das DNA / RNA polimerases (MAYNARD *et al.*, 2009).

As proteínas associadas a agentes genotóxicos pertencem à classe de reparo do DNA e a outras funções relacionadas. A proteína ERO1A, em nossos estudos esteve presente em todos os tratamentos, tendo sua expressão diminuída nas substâncias 5-3 e 5-5 e aumentada na 5-6. Essa proteína catalisa a formação de ligações de dissulfeto, oxida a proteína dissulfeto isomerase (PDI) e para manter o estado oxidado, reduz o oxigênio molecular formando peróxido de hidrogênio (TAVENDER & BULLEID, 2010). Outras duas proteínas também relacionadas com a resposta ao estresse oxidativo são a GFAP e a VIME. Essas duas proteínas foram encontradas aumentadas nas substâncias 5-3 e 5-5. Estudos recentes demonstram que a eliminação de ROS é prejudicada na ausência desses dois filamentos

intermediários (PABLO *et al.*, 2013). A proteína NQO1 é uma enzima que está envolvida em vários processos celulares relevantes no câncer. Ela também estabiliza as proteínas de resposta ao stress, tais como p53 e p73 e modula a via de NF- κ B (ASHER *et al.*, 2005; ROSS *et al.*, 2011; FAGERHOLM *et al.*, 2013). Neste estudo ela foi encontrada aumentada no tratamento com a substância 5-3 e diminuída no tratamento com a substância 5-5.

Foram encontradas também proteínas relacionadas diretamente ao dano de DNA. A proteína H4 encontra-se em níveis diminuídos tanto no tratamento com a substância 5-3 quanto na substância 5-6. Um estudo realizado por Lyang e colaboradores em 2012, demonstrou que o aumento da expressão do gene que codifica a histona resultou em sensibilidade aumentada danos do DNA, enquanto a eliminação de um par de genes H3-H4 resultou em níveis reduzidos de livre H3 (histona 3) e H4 (histona 4), concomitante com a resistência a agentes de causadores de danos no DNA. A proteína TERA, que se apresentou aumentada no tratamento com a substância 5-3 e diminuída na 5-5 também esta relacionada com o reparo de DNA. Uma mutação no gene da proteína pode diminuir sua funcionalidade aumentando a quantidade de DNA dupla fita não reparado (FUJITA *et al.*, 2012). A diminuição da proteína NPM pode inibir a reparação do DNA e ser usada como alvo terapêutico (SEKHAR *et al.*, 2011). Neste estudo observou-se que a proteína NPM esta aumentada na substância 5-3 sugerindo aumento na estabilidade ou no reparo de quebras no DNA.

No contexto de uma resposta celular global, a resposta final da célula à lesões no DNA depende de um balanço entre as vias de *checkpoints*, reparo e apoptose (ILIAKIS *et al.*, 2003; BREE *et al.*, 2004). Se os níveis de lesões induzidas no DNA são suficientes para ativar os mecanismos de *checkpoints* e sinalizar em direção as vias de reparo, é plausível supor que a predominância de sinalização molecular seja em grande parte, direcionada ao reparo e sobrevivência. Nossos resultados demonstraram um grande numero de proteínas envolvidas no reparo de DNA e resposta a geração de ROS, no entanto, não foi possível traçar uma via específica de reparo, possivelmente porque nem sempre a maquinaria celular se mostra de uma maneira específica, porém, multifuncional.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que as substâncias avaliadas, não apresentaram citotoxicidade em células HepG2.

Na avaliação da quimioprevenção pelo ensaio de indução da enzima quinona redutase, os resultados demonstraram que em contato com as substâncias testadas, a linhagem celular Hepa1c1c7 não foi capaz de promover a indução de quinona redutase. Também não foi observado efeito genotóxico pela avaliação do ensaio do cometa em nenhuma das concentrações testadas. No ensaio de antigenotoxicidade, todas as substâncias apresentaram um efeito protetor contra danos induzidos por peróxido de hidrogênio e somente três das substâncias testadas apresentaram reparo contra danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio. Devido aos resultados positivos nos testes de antigenotoxicidade, se faz necessário a avaliação de outras enzimas de fase 2 que possam estar conferindo à célula esse efeito protetor contra danos causados por peróxido de hidrogênio.

Os ensaios de proteômica demonstraram uma expressão diferencial no perfil proteico em cada substância, mesmo sendo quimicamente muito similares, contendo subunidades de ácido gálico e reparando danos segundo o ensaio de antigenotoxicidade. Os compostos possuem ação diferente quando se trata de reparo a danos induzidos por peróxido de hidrogênio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agripino, D.G. *et al.* "Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic Rain Forest - Ecological Station Juréia-Itatins." *Biota Neotropica* (4), 2004, pp.1--15.
- Alberts, D. S. and Garcia, D. J. "An overview of clinical cancer chemoprevention studies with emphasis on positive phase III studies.," *J Nutr* (125:3 Suppl), 1995, pp. 692S--697S.
- Alberts, D. S.; Colvin, G. M.; Conney, A. H. Prevention of cancer in the
- Amin, A., "Protective effect of green algae against 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced breast cancer in rats." *Int. J. Cancer Res.*(5), 2009, pp.12-24.
- Asher G, Tsvetkov P, Kahana C *et al.* A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev* 2005; 19: 316--321.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. "Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.," *Quím. Nova*(29), 2006, pp. 113--123.
- Blume-Jensen, P.; Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, v. 411, n. 6835, p.355--365, 2001.
- Bozeto, J. M. S., **Efeito antitumoral genotóxico e mutagênico de nitensidina A em camundongos *nude* BALB/c com implante tumoral xenográfico de células imortalizadas com HPV – 16 (SiHa).** 2011. 104f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- Bree, R. T.; Neary, C.; Samali, A. & Lowndes, N. F. (2004), 'The switch from survival responses to apoptosis after chromosomal breaks.', *DNA Repair (Amst)* 3(8-9), 989--995.
- Brendler-Schwaab S., Hartmann A., Pfuhler S., Speit G. The *in vivo* comet assay:

- Use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 2005;20:245–254.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D. and Ravanat, J.-L. "Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features.," *Mutat Res* (531:1-2), 2003, pp. 5--23.
- Calixto, João B.. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc. Cult.*, São Paulo, v. 55, n. 3, Sept. 2003 . Available from <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300022&lng=en&nrm=iso>. access on 26 Apr. 2012.
- Cao, G. and Prior, R. L. "Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples.," *Methods Enzymol* (299), 1999, pp. 50--62.
- Cariño-Cortés, R., Hernández-Ceruelos, A., Torres-Valencia, J. M., González-Avila, M., Arriaga-Alba, M. and Madrigal-Bujaidar, E. "Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test.," *Toxicol In Vitro* (21:4), 2007, pp. 691--697.
- Cavalcante, R., *As plantas na Odontologia: Um guia prático*. Rio Branco, 2007
- Cavalcanti, B.C.; Costa-Lotufo, L.V.; Moraes, M.O.; Burbano, R.R.; Silveira, E.R.; Cunha, K.M.; Rao, V.S; Moura, D.J.; Rosa, R.M.; Henriques, J.A; Pessoa, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in *Copaiba* oil. *Food and Chemical Toxicology.*, v. 44, p. 388-392, 2006.
- Collins, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology*, v. 26, p. 249-257, 2004.
- Cragg, G. M. and Newman, D. J. "Plants as a source of anti-cancer agents.," *J Ethnopharmacol* (100:1-2), 2005, pp. 72--79.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. and Snader, K. M. "Natural products in drug discovery and development.," *J Nat Prod* (60:1), 1997, pp. 52--60.
- Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M., "Natural products in drug discovery and development." *J. Nat. Prod.*, v.60, 1997, pp.52-60.

- Cuendet, M., Oteham, C. P., Moon, R. C. and Pezzuto, J. M. "Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention.," *J Nat Prod* (69:3), 2006, pp. 460--463.
- Davies, H.W.; Kennedy, S.M.; Teschke, K.; Quintana, P.J. Citogenetic analysis of South Asian berry pickers in British Columbia using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, v. 416, p. 101-113, 1998.
- de Pablo, Y.; Nilsson, M.; Pekna, M. & Pekny, M. (2013), 'Intermediate filaments are important for astrocyte response to oxidative stress induced by oxygen-glucose deprivation and reperfusion.', *Histochem Cell Biol* 140(1), 81--91.
- Dewick, P. M. (2002) **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.**(cap 2) 2nd Ed. West Sussex: Wiley.
- Di Stasi, L.C. Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo Interdisciplinar. São Paulo/SP: 1996. pp. 9--86.
- Duthie, G. G., Duthie, S. J. and Kyle, J. A. "Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants.," *Nutr Res Rev* (13:1), 2000, pp. 79--106.
- EMBRAPA 2005 – Eletroforese Bidimensional e Análise de proteomas, Comunicado técnico, 2005 Disponível em : www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/187102/1/cot136.pdf Acessado em 26 de abril de 2010.
- Fagerholm, R.; Sprott, K.; Heikkinen, T.; Bartkova, J.; Heikkilä, P.; Aittomäki, K.; Bartek, J.; Weaver, D.; Blomqvist, C. & Nevanlinna, H. (2013), 'Overabundant FANCD2, alone and combined with NQO1, is a sensitive marker of adverse prognosis in breast cancer.', *Ann Oncol*.
- Fahey, J. W., Dinkova-Kostova, A. T., Stephenson, K. K. and Talalay, P. "The "Prochaska" microtiter plate bioassay for inducers of NQO1.," *Methods Enzymol* (382), 2004, pp. 243--258.
- Fairbairn, D. W.; Olive, P.L.; O'Neill, K.L. The comet assay: a comprehensive review.

- Mutat. Res., v. 339, p.37-59, 1995.
- Farmacêuticas Básicas e Aplicadas, v. 27, n. 1, p. 1–7, 2006.
- Fenech, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol. Med.*, v. 111, p. 3-32, 2005.
- Fenech, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research*, v.392, p. 11–18, 1997.
- Fujita, K.; Nakamura, Y.; Oka, T.; Ito, H.; Tamura, T.; Tagawa, K.; Sasabe, T.; Katsuta, A.; Motoki, K.; Shiwaku, H.; Sone, M.; Yoshida, C.; Katsuno, M.; Eishi, Y.; Murata, M.; Taylor, J. P.; Wanker, E. E.; Kono, K.; Tashiro, S.; Sobue, G.; Spada, A. R. L. & Okazawa, H. (2013), 'A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases.', *Nat Commun* 4, 1816.
- future perspectives in bioprospecting. *Current drug targets*, v. 12, n. 11, p. 1515-1530, 2011.
- Genebra, Suíça: WHO Press, 2008,116p.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. “Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.” *Quím. Nova* (30), 2007, pp. 374--381.
- Gordon, M. H. “Dietary antioxidants in disease prevention.” *Nat Prod Rep* (13), 1996, pp. 265--273.
- Greenwald, P.; Kelloff, G.; Burch-Whitman, C.; Kramer, B. S. *Chemoprevention. CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 45, n. 1, p. 31–49, 1995.
- Gross, H. B.; Dalebout, T.; Grubb, C.D.; Abel, S. Functional detection of chemopreventive glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.*, v.159, p.265-272,2000.
- Hamburger, M., Hostettmann, K., Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30 (12), 1991, pp. 3864–3874.

- Heddle, J.A.; Cimino, M.C.; Hayashi, M.; Romagna, F.; Sheelby, M.D.; Tucker, J.D.; Vanparys, P.H.; Maccgregor, J.T. Micronuclei as an index of cytogenic damage: Past, Present, and Future. *Environ. Mol. Mutag.*, v. 18, p. 277-291, 1991.
- Hirayama, O., Takagi, M., Hukumoto, K. and Katoh, S. "Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence.," *Anal Biochem* (247:2), 1997, pp. 237--241.
- Ikuma, N.E.M.; Passoni, H.M.; Biso, I.F.; Longo, C.M.; Cardoso, P.R.C.; Campaner, S.L.; Varanda, A.E. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. *Toxicology in Vitro*, v. 20, p. 361–366, 2006.
- Iliakis, G.; Wang, Y.; Guan, J. & Wang, H. (2003), 'DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation.', *Oncogene* 22(37), 5834--5847.
- Jeong, T.J.; Moon, J.-H.; Park, K.H.; Shin, S.Ch. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 2123–2128, 2006.
- Kang, Y.; Pezzuto, J.M. Induction of Quinona Reductase as a Primary Screen for Natural Product Anticarcinogens. *Methods in Enzimology*, v. 382, p. 380-413, 2004.
- Kellof, G.J., 2000. Perspective on cancer chemoprevention research and drug development. *Adv. Cancer Res.*, 78: 199-334.
- Kirsch-Volders, M.; Sofuni, T.; Aardema, M.; Albertini, S.; Eastmond, D.; Fenech, M.; Ishidate, M. Jr.; Kirchner, S.; Lorge, E.; Morita, T.; Norppa, H.; Surrallés, J.; Vanhauwaert, A.; Wakata, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research*, v. 540, p. 153–163, 2003.
- Kundu, K.J.; Surh, J-Y. Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with antiinflammatory phytochemicals. *Mutation Research*, v. 591, p. 123–146, 2005.
- Liang, D.; Burkhart, S. L.; Singh, R. K.; Kabbaj, M.-H. M. & Gunjan, A. (2012),

- 'Histone dosage regulates DNA damage sensitivity in a checkpoint-independent manner by the homologous recombination pathway.', *Nucleic Acids Res* 40(19), 9604--9620.
- Liu, J. J., Huang, R. W., Lin, D. J., Peng, J., Wu, X. Y., Pan, X. L., Li, M. Q. and Lin, Q. "Anti-proliferative effects of oridonin on SPC-A-1 cells and its mechanism of action.," *J Int Med Res* (32:6), 2004, pp. 617--625.
- Lokvam, J., Clausen, T. P., Grapov, D., Coley, P. D. and Kursar, T. A. "Galloyl depsides of tyrosine from young leaves of *Inga laurina*., " *J Nat Prod* (70:1), 2007, pp. 134--136.
- Lorenzi, H. "Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.," Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 2002 (1).
- Marqui, S. R., **Bioprospecção em espécies de Fabaceae: agentes quimiopreventivos e substâncias de interesse agroecológico.** 2001. 203f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- Maynard, S.; Schurman, S. H.; Harboe, C.; de Souza-Pinto, N. C. & Bohr, V. A. (2009), 'Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging.', *Carcinogenesis* 30(1), 2--10.
- Migliore, L. and Coppedè, F. "Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases.," *Mutat Res* (512:2-3), 2002, pp. 135--153.
- Moller, P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 98, p. 336--345, 2005.
- Moongkarndi, P., Kosem, N., Luanratana, O., Jongsomboonkusol, S. and Pongpan, N. "Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line.," *Fitoterapia* (75:3-4), 2004, pp. 375--377.
- Myhrstad, M. C. W., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R. and Øivind Moskaug, J. "Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of

the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter.," *Free Radic Biol Med* (32:5), 2002, pp. 386--393.

Myhrstad, M. C. W., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R. and Øivind Moskaug, J. "Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter.," *Free Radic Biol Med* (32:5), 2002, pp. 386--393.

Natural Product Chemopreventive Agents. In.: KELLOFF, G. J.; HAWK, E. T.; SIGMAN, C. C. (Ed.). Cancer Chemoprevention, Volume 2: Strategies for Cancer Chemoprevention. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc., 2005, v. 2, cap. 1, p. 3-.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products* 66, 1022–1037.

nextvmillennium: Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. *Cancer Research*, v. 59, n. 19, p. 4743–4758, 1999.

Nielsen, F., Mikkelsen, B. B., Nielsen, J. B., Andersen, H. R. and Grandjean, P. "Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors.," *Clin Chem* (43:7), 1997, pp. 1209--1214.

Nogueira, R. C., de Cerqueira, H. F. and Soares, M. B. P. "Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience.," *Expert Opin Ther Pat* (20:2), 2010, pp. 145--157.

Oliveira, P. A.; Colaço, A.; Chaves, R. et al. Chemical carcinogenesis. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

Ootani, M. A. **Atividade inseticida, antifúngica e herbitóxica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citridora* e *Cymbopogon nardus*.**, 2010. 121f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Agronomia,

Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2010.

Organização Mundial da Saúde (OMS). The global burden of disease: 2004 update.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M. and Prior, R. L. "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.," *J Agric Food Chem* (49:10), 2001, pp. 4619--4626.

Pandey A, Mann M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000 Jun 15;405(6788):837-46.

Payne, G., Bringi, V., Prince, C., Shuller, M., The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture, *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Oxford University Press, Oxford. 1991.

Peres L., Metabolismo secundário [cited 2007 nov 10]. Available from: <http://www.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=faaa31248d8149ee235c5eb0cb54830e>. Acesso em 23 de julho de 2013.

Pezzuto, J. M. "Plant-derived anticancer agents.," *Biochem Pharmacol* (53:2), 1997, pp. 121--133.

Pezzuto, J. M.; Kosmeder, J. W.; Park, E. J. *et al.* Chapter 1: Characterization of Poterat, O., Hostettmann, K., "Plant sources of natural drugs and compounds. In encyclopedia of environmental biology." Academic Press, v.3, 1995.

Prochaska, H. J. and Santamaria, A. B. "Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers.," *Anal Biochem* (169:2), 1988, pp. 328--336.

Prochaska, H. J., Santamaria, A. B. and Talalay, P. "Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens.," *Proc Natl Acad Sci U S A* (89:6), 1992, pp. 2394--2398.

Ramesha, B. T.; Gertsch, J.; Ravikanth, G. *et al.* Biodiversity and chemodiversity:

- Rates, S. M. "Plants as source of drugs.," *Toxicon* (39:5), 2001, pp. 603--613.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.," *Free Radic Biol Med* (26:9-10), 1999, pp. 1231--1237.
- Rice-Evans, C. A. and Miller, N. J. "Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food.," *Biochem Soc Trans* (24:3), 1996, pp. 790--795.
- Riva, C.; Binelli, A.; Cogni, D.; Provini, A. Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether (BDE-209) in hemocytes of *Dreissena polymorpha* using the comet and micronucleus assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 48, n. 9, p. 735-43, 2007.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., "Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits.," 1999 (66), pp401-436.
- Ross D, Zhou H, Siegel D. Benzene toxicity: The role of the susceptibility factor NQO1 in bone marrow endothelial cell signaling and function. *Chem Biol Interact* 2011; 192: 145–149.
- Scarano, F. R. Perspectives on biodiversity science in Brazil. *Scientia Agricola*, v. 64, n.4, p. 439–447, 2007.
- Scolastici, C., de Lima, R. O. A., Barbisan, L. F., Ferreira, A. L. A., Ribeiro, D. A. and Salvadori, D. M. F. "Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test.," *Toxicol In Vitro* (22:2), 2008, pp. 510--514.
- Sekhar, K. R.; Reddy, Y. T.; Reddy, P. N.; Crooks, P. A.; Venkateswaran, A.; McDonald, W. H.; Geng, L.; Sasi, S.; Waal, R. P. V. D.; Roti, J. L. R.; Salleng, K. J.; Rachakonda, G. & Freeman, M. L. (2011), 'The novel chemical entity YTR107 inhibits recruitment of nucleophosmin to sites of DNA damage, suppressing repair of DNA double-strand breaks and enhancing radiosensitization.', *Clin Cancer Res* 17(20), 6490--6499.

- Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F., Larondelle, Y., "Antioxidant activities and polyphenol contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region." *Food Chem* (101), 2007, pp.1012-1018.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS, 1999.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.," *Exp Cell Res* (175:1), 1988, pp. 184--191.
- Soares S.E., Phenolic acids as antioxidants., (2002) *Revista de Nutricao*, 15 (1) ,pp. 71-81.
- Song, L. L., Kosmeder, J. W., Lee, S. K., Gerhäuser, C., Lantvit, D., Moon, R. C., Moriarty, R. M. and Pezzuto, J. M. "Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes.," *Cancer Res* (59:3), 1999, pp. 578--585.
- Souza, J. N. S., Silva, E. M., Silva, M. N, Arruda, M. S. P., Larondelle, Y., Rogez, H., " Identification and Antioxidant Activity of Several Flavonoids of *Inga Edulis* Leaves." *Journal of Brazilian Chemical Society*(18), 2007, n. 6, pp.1276--1280.
- Souza, J.n.S.; Silva, e.m.; loir, a.; Rees, J.F.; Rogez, R. Larondelle, Y., "Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological in vitro assays.," *Food Chemistry*(106),2008: 331–339.
- Sporn, M. B., Dunlop, N. M., Newton, D. L. and Smith, J. M. "Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids).," *Fed Proc* (35:6), 1976, pp. 1332--1338.
- Stoner, G. D., Morse, M. A. and Kelloff, G. J. "Perspectives in cancer chemoprevention.," *Environ Health Perspect* (105 Suppl 4), 1997, pp. 945--

- Sun, A. Y. and Chen, Y. M. "Oxidative stress and neurodegenerative disorders.," *J Biomed Sci* (5:6), 1998, pp. 401--414.
- Suresh S, Sujatha Mohan S, Mishra G, Hanumanthu GR, Suresh M, Reddy R, Pandey A: **Proteomic resources: Integrating biomedical information in humans.** *Gene* 2005, **364**:13-18.
- Tamimi, R. M., Lagiou, P., Adami, H.-O. and Trichopoulos, D. "Prospects for chemoprevention of cancer.," *J Intern Med* (251:4), 2002, pp. 286--300.
- Tan, G., Gyllenhaal, C. and Soejarto, D. D. "Biodiversity as a source of anticancer drugs.," *Curr Drug Targets* (7:3), 2006, pp. 265--277.
- Tavender, T. J. & Bulleid, N. J. (2010), 'Molecular mechanisms regulating oxidative activity of the Ero1 family in the endoplasmic reticulum.', *Antioxid Redox Signal* 13(8), 1177--1187.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. and Sasaki, Y. F. "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.," *Environ Mol Mutagen* (35:3), 2000, pp. 206--221.
- Torous, D.K.; Dertinger, S.D.; Hall, N.E.; Tometsko, C.R. An automated method for discriminating Aneugen vs. Clastogen- induced micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.31, p.340-344, 1998.
- Vanparys, P.; Dekenudt, G., Vermeiren, F.; Sysmans, M.; Marsboom, R. Sampling times in micronucleus testing. *Mutation Research*, v. 282, p. 191-196, 1992.
- Varanda, E. A. Atividade Mutagênica de Plantas Medicinais. *Revista de Ciências*
- Vivot, E., de Dios Muñoz, J., del Carmen Cruaños, M., Cruaños, M. J., Tapia, A., Hirschmann, G. S., Martínez, E., Sapio, O. D., Gattuso, M. and Zacchino, S. "Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic

- characteristics.," *J Ethnopharmacol* (76:1), 2001, pp. 65--71.
- Wattenberg, L. W. "Chemoprevention of cancer.," *Cancer Res* (45:1), 1985, pp. 1--8.
- Weisburger, J. H. "Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea.," *Food Chem Toxicol* (37:9-10), 1999, pp. 943--948.
- Winters, M. "Ancient medicine, modern use: *Withania somnifera* and its potential role in integrative oncology.," *Altern Med Rev* (11:4), 2006, pp. 269--277.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., Newmark, H. L., "Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds.," *Annu Rev Nutr.*(21), 2001, pp.381--406.
- Yoshida, M., Fuchigami, M., Nagao, T., Okabe, H., Matsunaga, K., Takata, J., Karube, Y., Tsuchihashi, R., Kinjo, J., Mihashi, K. and Fujioka, T. "Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*.," *Biol Pharm Bull* (28:1), 2005, pp. 173--175.
- Zhang, Y., Wu, L.-J., Tashiro, S.-I., Onodera, S. and Ikejima, T. "Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis.," *Acta Pharmacol Sin* (25:1), 2004, pp. 83--89.