

ELIZIANI MIEKO KONTA

**EFEITO DA POLPA DE MARACUJÁ AMARELO (*Passiflora
edulis* f. *flavicarpa* Deg) SOBRE OS DANOS GENOTÓXICOS E
NEFROTÓXICOS IMEDIATOS INDUZIDOS PELA CISPLATINA
EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Araraquara/SP

2009

ELIZIANI MIEKO KONTA

EFEITO DA POLPA DE MARACUJÁ AMARELO (*Passiflora. edulis f. flavicarpa* Deg) SOBRE OS DANOS GENOTÓXICOS E NEFROTÓXICOS IMEDIATOS INDUZIDOS PELA CISPLATINA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, área de concentração: Ciências Nutricionais, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito parcial para a obtenção do título de mestre

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Lourdes Pires Bianchi

Araraquara/SP

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

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

K82e	Konta, Eliziani Mieko Efeito da polpa de maracujá amarelo (<i>Passiflora edulis f. flavicarpa Deg</i>) sobre os danos genotóxicos e nefrotóxicos imediatos induzidos pela cisplatina em ratos espontaneamente hipertensos / Eliziani Mieko Konta. – Araraquara, 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição Orientador: Maria de Lourdes Pires Bianchi . 1.Polpa de maracujá. 2.Cisplatina. 3.Nefrotoxicidade. I.Bianchi, Maria de Lourdes Pires, orient. II.Antunes, Lusânia Maria Greggi, co-orient.. III.Título.
------	--

CAPES: 50700006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eliziani Mieko Konta

Efeito da polpa de maracujá amarelo (*Passiflora. edulis f. flavicarpa* Deg) sobre os danos genotóxicos e nefrotóxicos imediatos induzidos pela cisplatina em ratos espontaneamente hipertensos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências Nutricionais

Banca Examinadora

Profª Drª Maria de Lourdes Pires Bianchi (Orientadora)

Profª Drª Eliana Aparecida Varanda (Membro Titular)

Profª Drª Heloísa Della Coletta Francescato (Membro Titular)

Defendida e aprovada pela comissão julgadora em 13/02/2009

DEDICATÓRIA

Dedico...

Ao papai, MASSAJI KONTA, este homem que eu tanto admiro, meu maior exemplo de honestidade e sabedoria. Alguém que com seu jeito tímido, mas sempre acolhedor e brincalhão soube, de maneira admirável, transmitir e orientar qual o melhor caminho a seguir...

À mamãe, REGINA MIEKO KONTA, esta mulher ímpar dotada de uma garra e determinação jamais vistas. Impetuosa e impulsiva, alegre e motivadora, com muito amor nos anima em seus braços, ouve, mima e aconselha nas mais variadas situações, sempre apoiando e principalmente acreditando em nossas escolhas e agigantando nossa bravura...

À todos os meus familiares, em especial, às minhas Tias Luzia Setuko Umeda, Elisabete Keiko Umeda e Márcia Yuriço Umeda, que há 26 anos sempre estiveram do meu lado. Por tudo que representam na minha vida, incentivo, apoio e entusiasmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Profa Dra Maria de Lourdes Pires Bianchi, minha orientadora e amiga, por ter trilhado os caminhos e me indicado as melhores direções, estando sempre prontamente disponível para ouvir e ajudar quando as dificuldades apareciam.

À Profa Dra Lusânia Maria Gregg Antunes, pelo apoio, incentivo, carinho e suas sugestões e auxílio tão necessários neste trabalho.

Aos meus professores da graduação em Nutrição da Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, pela ótima formação acadêmica, me tornando apto ao ingresso na pós-graduação.

Aos Membros da Banca Examinadora, por sua disposição e paciência em analisar esse trabalho e trazer contribuições preciosas para a sua finalização.

Às secretárias Cláudia, Laura e Sônia, da Pós Graduação, os meus mais sinceros agradecimentos pelo prestativo atendimento, pela ajuda, atenção, por toda paciência.

Ao Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por ter gentilmente cedido os animais SHR, possibilitando a implantação do novo modelo de animais ao laboratório.

À Mayara Santos Gomes, do Departamento de Físico-Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela ajuda no manuseio e aferição da pressão dos animais.

À Indústria e Comércio de Frutas Ricaeli, pela doação das polpas de maracujá e pelo grande auxílio e apoio na realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e à FAPESP pela concessão de auxílio financeiro e a todas as agências de fomento à pesquisa que contribuíram para a estruturação do laboratório de Bromatologia e Nutrição, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

É muito bom poder agradecer a tantas pessoas que, durante estes anos, em que se é acometido de inúmeros surtos de tristeza, euforia, incertezas, cansaço e alegrias, conseguiram se manter simplesmente PRESENTES.

A DEUS, que em toda sua infinita grandeza e generosidade me deu meios e tornou apto a conduzir e concluir este trabalho, aprendendo muito mais que pura e simplesmente como fazer ciência, me mostrando um pouco mais sobre a complexidade de nossa existência nos planos científicos e das relações humanas, e de alguma maneira me permitindo contribuir para aumentar o conhecimento humano.

Aos meus pais, Massaji e Regina, referência para mim ao longo de toda minha existência, incentivadores e orgulhosos, pelo imenso e incondicional amor, constante estímulo, enorme dedicação, paciência, compreensão e pelas orações. Meu reconhecimento e eterna gratidão... sem vocês eu nada seria.

Ao meu irmão, Alessandro Massaji Konta, um sonhador admirável, batalhador e persistente, que não faz idéia do quanto é imprescindível em minha vida, pela amizade, companheirismo e amor constantes.

Aos meus eternos amigos de Pós-Graduação e companheiros de vôlei, Alexandre Ferro Aissa, Cátia Lira do Amaral, Estela Beatriz Behling, Graciela Cristina dos Santos, Juliana Carvalho, Rafaela de Barros e Lima Bueno, Leonardo Meneghin Mendonça, Lívia Hernandez, Natália Sakura Koyama, Patrícia Furlan, Rita de Cássia Oliveira. Pelo convívio diário estando sempre dispostos a ajudarem nos pequenos ou grandes problemas decorrentes das atividades de pesquisa.

Aos meus inseparáveis amigos de Araraquara e Botucatu, Caio Casale Aragon, Andréia Cristina de Almeida Silva, Tamara Miranda Miyazawa, Talita Miranda Miyazawa e Marina Nogueira Berbel.

A técnica Joana D'arc C. Darin por ter me ensinado a manusear os animais e as dosagens bioquímicas. Também não posso esquecer-me da ajuda e amizade que ela sempre me forneceu para enfrentar os desafios e as dificuldades que surgiram ao longo do desenvolvimento do nosso trabalho.

Existem pessoas às quais gostaria de dedicar especial atenção pela importância que representam e agradecer de maneira única e singular, entretanto, não me perdoaria se a memória falhasse e omitisse algum nome, portanto, vou-lhes expressar meu carinho de forma generalizada, mas cada um sabe de sua importância individual em minha vida...

AMIGOS...

Aos que estão longe, por acreditarem em meu trabalho e compreenderem minha “aparente” ausência... são exemplos de pessoas com uma forma toda especial de ser e incentivar, mesmo sem estarem presentes, ao longo dos anos vimos que a distância não é suficiente para nos separar;

Aos que estão próximos, em casa ou no laboratório, pela paciência em acompanhar todos os dias deste trabalho, por “aturarem” as inconstâncias de humor, me fazerem rir, emprestarem o ombro para chorar, motivar e principalmente por sempre estarem ao meu lado;

Aos mais recentes, agradeço por me incluírem em seus círculos de amizades e por compartilharem comigo tão bons momentos;

Aos mineiros, cearenses e paulistas que tanto me agüentaram nas horas de choro, desespero e alegrias, por mais que estivessem muito distantes, me consolavam e me alegravam por telefone, mensagens ou simplesmente um e-mail;

Aos de longa data, pelo companheirismo, estando constantemente ao meu lado ainda que apenas em pensamento, pela dedicação e sinceridade nas palavras e atitudes;

Aos meus amigos-irmãos, pessoas convictas, delicadas, sensíveis e também rudes e práticas quando necessário, simplesmente por lições que não podem ser encontradas em livros, vocês são fundamentais.

Enfim, a TODOS que, direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta etapa, bem como para meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1- DIETA E CÂNCER: ESTRESSE OXIDATIVO X ANTIOXIDANTES	1
1.2- MARACUJÁ (GÊNERO <i>PASSIFLORA</i>)	5
1.3- CISPLATINA	8
1.4- RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS	15
1.5 – MODELOS DE AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE	17
2- OBJETIVOS.....	22
2.1- OBJETIVO GERAL.....	22
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3- MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1- MATERIAL	23
3.1.1- Planejamento Experimental	24
3.2- MÉTODOS.....	27
3.2.2-Avaliação da função renal	27
3.2.2.1- Determinação dos níveis de creatinina plasmática e urinária	27
3.2.2.2- Determinação da proteinúria	28
3.2.2.3- Determinação do volume urinário	28
3.2.2.4- Relação peso órgãos/peso corpóreo	28
3.2.2.5- Determinação dos níveis de glutathione renal	28
3.2.2.6- Determinação dos níveis de proteína tecidual	29
3.2.2.7- Determinação do malondialdeído tecidual	29
3.2.3 –Aferição da Pressão Arterial	30
3.2.4-Avaliação da toxicidade genética	30
3.2.4.1- Técnica do Micronúcleo em células da medula óssea de ratos	30
3.2.4.2- Ensaio do Cometa <i>in vivo</i>	33
3.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4- RESULTADOS	38
5- DISCUSSÃO	53
6- CONCLUSÃO	72
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
4-HNE	4-hidroxi-2(E)-nonenal
CAT	Catalase
CCl_4	Tetracloroeto de carbono
cDDP	Cisplatina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTNB	5,5'-ditiobis-(ácido-2-nitrobenzóico)
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ERs	Espécies reativas
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FT	Fenólicos Totais
FDA	<i>American Food and Drug Administration</i>
g	Gramas
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GO	Glutaciona oxidase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSSG	Glutaciona dissulfeto
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HNO_2	Ácido nitroso
iNOS	Óxido nítrico induzível
i.p.	Intraperitoneal
KBrO_3	Brometo de potássio
Kg	Quilos
mA	Mili ampers
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas

mM.....	Micro molar
MNs	Micronúcleos
N ₂ O ₃	Óxido nitroso
NaCl 0,9%.....	Solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v)
NCE	Eritrócitos normocromáticos
NO	Óxido nítrico
NO ⁻	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitritos
NO ₃ ⁻	Nitratos
NTA.....	Necrose tubular aguda
O ₂ ⁻	Superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
p.c.	Peso corpóreo
PAS.....	Pressão arterial sistólica
PCE	Eritrócitos policromáticos
PMN.....	Polimorfonuclear
Pt	Platina
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
RO [•]	Alcoxila
ROO [•]	Peroxila
rpm	Rotações por minuto
SH.....	Grupos Sulfidrila
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rats</i>
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SRATB.....	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF.....	Fator de necrose tumoral
V	Volts
XO.....	Xantina oxidase

LISTA DE SÍMBOLOS

°C.....	Grau Celsius
μM.....	Micromolar
α	Alfa
β.....	Beta
δ.....	Gama
ζ.....	Zeta
μm ²	Micrômetro quadrado
M.....	Molar

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Esquema simplificado e adaptado dos sistemas oxidantes e antioxidantes nas células	3
Figura 02. Fórmula estrutural da cisplatina.....	8
Figura 03. Via de ação da cisplatina na célula	10
Figura 04. Formação e efeito dos adutos DNA-cisplatina	11
Figura 05. Informação nutricional da polpa de maracujá amarelo integral	23
Figura 06. Esquema simplificado do planejamento experimental.....	25
Figura 07. Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos e normocromáticos de medula óssea de ratos	32
Figura 08. Fotomicrografia de nucleóides de células hepáticas	36
Figura 09. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia, gavagem - doses múltiplas) sobre a evolução do peso corpóreo (gramas) em ratos sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg.	38
Figura 10. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia, gavagem - doses múltiplas) sobre os níveis renais de glutathione (nmol/mg proteína) em ratos sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg.	41
Figura 11. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia gavagem - doses múltiplas) sobre os níveis renais de MDA (nmol/g tecido) em ratos sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg	42

Figura 12. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia gavagem - doses múltiplas) sobre a pressão arterial sistólica, PAS (mmHg) em ratos sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg.....**43**

Figura 13. Distribuição das Classes dos Cometas de acordo com a % de Danos ao DNA, avaliados pelo Ensaio do Cometa, (A) Tecido Hepático e (B) Tecido Renal, para avaliar os efeitos de três doses da polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia gavagem - doses múltiplas) sobre a genotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos SHR e WISTAR sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg.....**52**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia, gavagem - doses múltiplas) na relação peso órgão/peso corpóreo e sobre níveis de creatinina plasmática (mg/dL), proteinúria (mg/24h) e volume urinário (mL/24h) em ratos sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg.....	40
Tabela 02. Frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos em 2000 células analisadas por animal (n=6/7) em cada tratamento, para avaliar os efeitos de três diferentes doses de polpa de maracujá amarelo e respectivos controles sobre a mutagenicidade induzida pela cisplatina (cDDP)	44
Tabela 03. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia gavagem - doses múltiplas) sobre a detecção de danos ao DNA utilizando o Ensaio do Cometa em 100 células hepáticas por ratos (n=6/7), sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg	46
Tabela 04. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia gavagem - doses múltiplas) sobre a detecção de danos ao DNA utilizando o Ensaio do Cometa em 100 células renais por ratos (n=6/7), sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg	49

RESUMO

Os antioxidantes, principalmente os encontrados na dieta, são agentes responsáveis pela inibição e redução dos danos oxidativos causados pelas espécies reativas nas células. A cisplatina (cDDP), um potente agente antineoplásico utilizado com frequência no tratamento de tumores sólidos, tem seu uso clínico limitado devido aos efeitos adversos como nefrotoxicidade, genotoxicidade e supressão da medula óssea. Como a geração de espécies reativas pode resultar em danos ao DNA pela ação destas espécies ou indiretamente via produtos de degradação da peroxidação lipídica, nosso estudo avaliou o possível efeito protetor da adição da polpa de maracujá amarelo na dieta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar normotensos, contra a nefrotoxicidade e genotoxicidade induzida pela cDDP. Os resultados obtidos nas condições experimentais estabelecidas neste trabalho mostraram que a cDDP promoveu um aumento dos níveis das substâncias reativas aos ácido tiobarbitúrico, bem como decréscimo nos níveis de glutatona nos rins dos animais SHR, reforçando a hipótese que a peroxidação lipídica está relacionada com o mecanismo de nefrotoxicidade. O tratamento com doses múltiplas da polpa de maracujá amarelo não alterou os outros parâmetros da função renal no período analisado. Embora o efeito protetor da polpa de maracujá contra os danos induzidos ao DNA em células renais e hepáticas não tenha sido evidente nos resultados obtidos pelo Ensaio do Cometa, a polpa foi eficaz na redução de micronúcleos induzidos pela cDDP. Assim, umas das hipóteses para a redução da pressão arterial sistólica observada neste trabalho, poder ser atribuída à presença de alguns compostos fenólicos e outros ainda não identificados na polpa. Visto que, a interação entre os fitoquímicos presentes na polpa de maracujá demonstraram eficácia na redução da mutagenicidade e efeitos protetores antioxidantes.

Palavras-chave: Polpa de maracujá amarelo, Cisplatina, Nefrotoxicidade, Danos no DNA, Ensaio do Cometa, Teste do Micronúcleo.

ABSTRACT

The antioxidants, particularly those found in the diet, are responsible for inhibiting and reducing the damage caused by reactive species in the cells. Cisplatin (cDDP), a potent anticancer agent often used in the treatment of solid tumors, has limited clinical use due to adverse effects such as nephrotoxicity, genotoxicity and myelosuppression. As the generation of reactive species can result in DNA damage by direct action of this or indirectly by degradation products of the lipid peroxidation, our study evaluated the potential protector of adding yellow passion fruit pulp to the diet of spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive wistar rats, against the nephrotoxicity and genotoxicity induced by cDDP. The results showed that the cDDP promoted an increase in the levels of thiobarbituric acid reactive substances and a decrease in the levels of glutathione in the kidneys of the animals, reinforcing the hypothesis that lipid peroxidation be related to the mechanism of nephrotoxicity. The treatment with multiple doses of passion fruit pulp did not change the others parameters of renal function in the schedule. Although the protective effect of passion fruit pulp against the damage caused to the DNA of kidney and hepatic cells has not been evident in the results obtained by Comet assay, the pulp was effective in the reduction of micronuclei induced by cDDP. One of the hypotheses for the reduction in systolic blood pressure observed in the present study attributed this effect to the presence of some phenolic compounds and others not yet identified in the passion fruit pulp. Furthermore, the interaction between the phytochemicals of the pulp demonstrated effectiveness in reducing the mutagenic and antioxidant effects.

Key words: Yellow passion fruit pulp, Cisplatin, Nephrotoxicity, DNA damage, Comet Assay, Micronucleus Test.

1. INTRODUÇÃO

1.1- Dieta e Câncer: Estresse Oxidativo x Antioxidantes

Atualmente, existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido às descobertas sobre o efeito das espécies reativas (ERs) no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo, assim, as espécies reativas são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (CERUTTI, 1994).

Espécies reativas cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) ou ERNs (Espécies Reativas de Nitrogênio). Estes termos são freqüentemente utilizados para descrever radicais como: O_2^- (superóxido), $OH^\cdot$ (radical hidroxila), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), 1O_2 (oxigênio singlete), $ROO^\cdot$ (peroxila), $RO^\cdot$ (alcoxila), $NO^\cdot$ (óxido nítrico), $ONOO^-$ (peroxinitrito), N_2O_3 (óxido nitroso), HNO_2 (ácido nitroso), NO_2^- (nitritos), NO_3^- (nitratos), e eles são importantes mediadores de danos oxidativos em diversos tecidos e órgãos, inclusive o rim (ARUOMA, 1994; CERUTTI, 1994; HALLIWELL et al., 1995).

No organismo, as ERs encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas. No entanto, o excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membranas e agressão às proteínas dos tecidos, às enzimas, carboidratos e DNA (ARUOMA, 1994; CERUTTI, 1994; HALLIWELL et al., 1995).

Essas espécies podem ser geradas durante o processo endógeno fisiológico e patológico, e também podem ser geradas por fontes exógenas como: substâncias

presentes nos alimentos, fármacos, luz ultravioleta, radiação ionizante, poluição, fumo, álcool, entre outras (HALLIWELL, 1994; ARUOMA, 1994).

Para minimizar os efeitos tóxicos das ERs, organismos aeróbios possuem sistemas de defesa com antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathione, particularmente a glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e os não-enzimáticos que envolvem a glutathione (GSH), peptídeos de histidina e proteínas ligadas ao ferro (ferritina e transferrina). Além destes antioxidantes, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno (pro-vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos nos quais se destacam os flavonóides (CHAN et al., 2006; FENECH, 2008).

O termo antioxidante refere-se a uma grande variedade de compostos com mecanismos de ação distintos. Halliwell et al. (1995) define antioxidantes como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou impede a oxidação desse substrato”. Os substratos oxidáveis da célula seriam as proteínas, lipídios, carboidratos e DNA.

O estresse oxidativo foi definido por este mesmo autor, como um balanço não adequado entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o mecanismo de defesa dos antioxidantes. Uma das consequências deste desequilíbrio é a reação dessas espécies com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, iniciando um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação que pode ser avaliado e utilizado como indicador do estresse oxidativo celular (HALLIWELL et al., 1995).

A membrana é o componente celular mais atingido pela peroxidação, acarretando alterações em sua estrutura e permeabilidade e, além disso, poderão

ocorrer as seguintes situações: (a) perda de seletividade na troca iônica, (b) liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, (c) formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído e (d) morte celular (HALLIWELL, 1994; PIETTA, 2000).

O radical $\text{OH}^\bullet$ é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo*. Estes radicais freqüentemente atacam moléculas por abstração de hidrogênio e por adição à insaturações, causam danos ao DNA, ao RNA, às proteínas, aos lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocôndria (Figura 1) (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

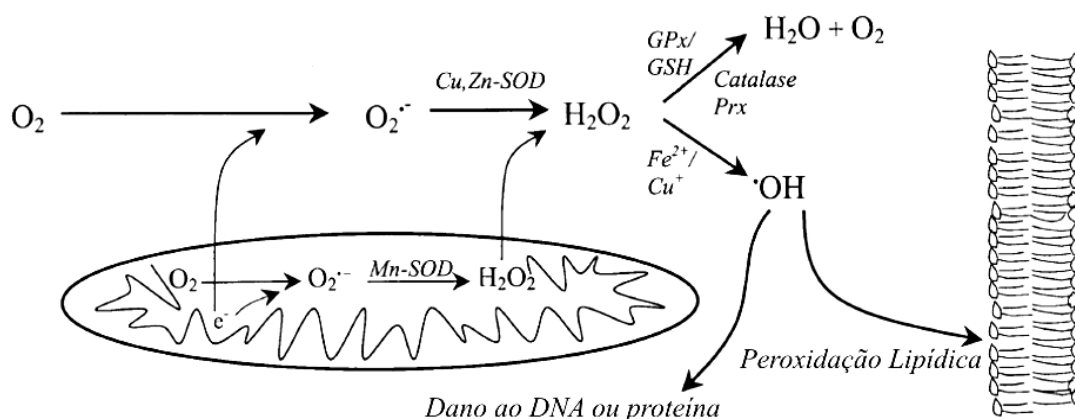


Figura 01. Esquema simplificado e adaptado dos sistemas oxidantes e antioxidantes nas células (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

No DNA, o radical $\text{OH}^\bullet$ ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose. O ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA. Nos aminoácidos e proteínas, o $\text{OH}^\bullet$ pode reagir na cadeia lateral, onde ataca preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, acarretando alterações estruturais e funcionais das proteínas afetadas. Os ataques aos

aminoácidos podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, podendo ter como consequência perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

A dieta representa um dos fatores mais importantes na promoção e progressão do câncer. Uma dieta equilibrada em micronutrientes pode contribuir para a estabilidade genômica. Mas, por outro lado, a deficiência de vitaminas e minerais pode gerar danos ao DNA devido às quebras e lesões oxidativas, assim, pequenas mutações são elementos chaves no processo neoplásico (FENECH e FERGUSON, 2001).

Esta preocupação com a identificação de fatores envolvidos na etiologia do câncer também inclui o papel da dieta e dos compostos bioativos dos alimentos, tanto como inibidores como ativadores da carcinogênese. Já foi descrito e bem documentado na literatura, que os compostos bioativos da dieta têm uma contribuição decisiva na etiologia dos cânceres humanos e várias abordagens são propostas para a identificação de compostos quimioprotetores, antimutagênicos e anticarcinogênicos, encontrados em frutas e vegetais (KNASMÜLLER et al., 2002).

Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos é encontrada uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (SGARBIERI e PACHECO, 1999; PIETTA, 2000).

No desenvolvimento de intervenções dietéticas efetivas na prevenção do câncer, é relevante o uso de modelos experimentais em animais, tanto para avaliar e confirmar os resultados *in vitro*, como para ampliar o potencial de uso dos testes,

que resultam em estudos clínicos e epidemiológicos. Portanto, os roedores constituem um bom modelo de investigações de intervenções ou modulações dietéticas (HURSTING et al., 2005).

1.2- Maracujá (gênero *Passiflora*)

Maracujá (do tupi *mara kuya*), "fruto que se serve na cuia" ou "alimento na cuia" é um fruto produzido pelas plantas do gênero *Passiflora* da família *Passifloraceae*. A maioria das 530 espécies é nativa da América Tropical, embora seja encontrado desde a região Amazônica até o Paraguai (PEREIRA et al., 2000). O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética dessa família de plantas, apresentando mais de 150 espécies nativas, cultivando cerca de 35.000 hectares e produzindo mais de 485 mil toneladas de frutos (PEREIRA et al., 2000; DHAWAN et al., 2004).

As espécies mais cultivadas no Brasil e em toda a América Tropical, para a obtenção de frutos para consumo *in natura* ou para fins de industrialização, são: *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., *P. edulis* f. *edulis* Sims, *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. macrocarpa*, *P. caerulea* e *P. laurifolia*. Mas a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo) destaca-se como a mais cultivada no Brasil e no Hawaí (PEREIRA et al., 2000).

O maracujá é consumido principalmente ao natural, possui aroma agradável, baixa acidez, elevados teores de sólidos solúveis totais e alto valor nutricional, o que o torna bem aceito pelos consumidores. Seu principal uso é na alimentação humana, na forma de sucos, doces, geléias, sorvetes e licores. O suco do maracujá é conhecido pelo seu valor nutricional, como também por seu sabor exótico. Destaca-

se que o maracujá-amarelo seja uma boa fonte de nutrientes, como vitamina C (18,2 mg/100g), vitamina A (2410 UI/100g), potássio (278 mg/100g), carotenóides (9,25 mg/L) e polifenóis (435 mg/L). Dentre os carotenóides majoritários, encontram-se α -caroteno (35 g/100g), β -caroteno (525 g/100g) e β -criptoxantina (46 g/100g) (TALCOTT et al., 2003; ZIBADI et al., 2007).

Em relação à perspectiva de exploração do gênero, ressalta-se que diversas classes de compostos químicos já foram isoladas de diferentes espécies, com destaque para *P. incarnata*, *P. alata* e *P. edulis*. Entre esses compostos têm-se os alcalóides, os flavonóides, os glicosídeos cianogênicos, as saponinas, fração de esteróide, as gomas, os taninos, as resinas, os carotenóides, o ácido ascórbico, as antocianinas, os aminoácidos e os minerais (DHAWAN et al., 2004, ZIBADI et al., 2007).

Dentre os flavonóides, os encontrados são do tipo C-glicosilados, sendo os mais estudados: vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina e apigenina; o gênero também apresenta outros como a crisina, luteolina, kaempferol e quercetina, caracterizados pelo grande potencial terapêutico, por atuarem como antioxidantes, imunomoduladores e anticarcinogênicos (PETRY et al., 2001; DHAWAN et al., 2004).

Quanto aos alcalóides, os encontrados são do tipo indólico. Destes, muitos têm valor na medicina como tranquilizantes e no tratamento de hipertensão. *P. incarnata* é a espécie mais estudada, sendo encontrados a harmina, harmol, harmalina, harmalol e harmana (PEREIRA, et al., 2000; DHAWAN et al., 2004). Alguns destes compostos, administrados isoladamente, demonstraram reduzir a pressão arterial em camundongos, além de prevenirem o desenvolvimento de falência cardíaca e insuficiência renal (ZIBADI, et al., 2004).

Espécies de *Passiflora* são muito populares, não apenas pelos frutos, mas também devido aos chás e extratos das suas folhas utilizados mundialmente como sedativos, diuréticos, no tratamento da hipertensão arterial e doenças da pele (DHAWAN et al., 2004; ZIBADI et al., 2007).

Vinci et al. (1995) analisaram os teores de ácido ascórbico de 11 frutas tropicais (incluindo o maracujá) e compararam com os teores de duas frutas cítricas (limão e laranja). O maracujá apresentou 64,78 mg/100g de ácido ascórbico, sendo que o limão e laranja apresentaram 51,3 e 49,8 mg/100g respectivamente. No entanto, Vasco et al. (2008) ao determinarem os teores de ácido ascórbico e fenólicos totais de 17 frutas regionais do Equador, encontraram valores menores para o maracujá. Sendo 30-40 mg/100g de ácido ascórbico e 61 ± 32 mg de ácido gálico/100 g para fenólicos totais. Vale ressaltar que, a composição e variedade da fruta, geografia, maturidade e sazonalidade podem interferir nas determinações dos referidos compostos.

Mercadante et al. (2002) identificaram 13 diferentes carotenóides em frutos de maracujá-amarelo, sendo que em todos os lotes da fruta *in natura* encontraram-se os seguintes carotenóides: β -caroteno, β -criptoxantina, prolicopeno, cis- δ caroteno, δ -caroteno, 13-cis- β -caroteno, no total de 15,36 a 27,14 mg/100g.

Kuskoski et al. (2005) determinaram o conteúdo de compostos fenólicos totais (FT), antocianinas e a capacidade antioxidante de algumas polpas de frutas congeladas. Sendo que na polpa de maracujá amarelo encontrou-se $20 \pm 2,6$ mg/100g (FT).

Os polifenóis são uma classe de compostos presentes naturalmente em frutas, vegetais e grãos. Muitos deles apresentam propriedades antioxidantes, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antiinflamatórias e mantêm a estabilidade

genômica; sendo, portanto, benéficas à saúde. No entanto, dependendo da dose utilizada, nem todos os polifenóis exercem atividades benéficas, alguns podem atuar como mutagênicos ou exercerem atividades como pro-oxidantes em sistemas biológicos (FERGUSON, 2001).

O efeito sinérgico dos fitoquímicos das frutas e vegetais tem sido proposto como responsável pelo poder antioxidante e atividades anticarcinogênicas. Entre os inúmeros compostos bioativos presentes na polpa de maracujá, compostos fenólicos, carotenóides, antocianinas e minerais têm sido descritos como agentes antimutagênicos quando administrados em modelos *in vivo* e *in vitro* (ZIBADI et al., 2007).

1.3- Cisplatina

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina II, cDDP) é membro de uma complexa classe de potentes agentes antineoplásicos, os complexos coordenados de platina (Figura 02). Foi sintetizada em 1845 e a estrutura determinada em 1893, sendo formada por um complexo de metal pesado, platina (Pt) com dois átomos de cloro (Cl) e duas moléculas de amônia (NH₃) na posição *cis* (GIACCONE, 2000; KOSMIDER e OSIECK, 2004; ALI e MOUNDHRI, 2006).

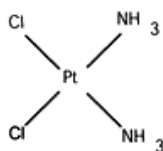


Figura 02. Fórmula estrutural da cisplatina.

A atividade biológica dos compostos de platina foi inicialmente observada por Rosenberg na década de 60, em estudos do efeito de campos

elétricos sobre o crescimento bacteriano. Nesses estudos, as bactérias *Escherichia coli* submetidas a um campo elétrico, proveniente de eletrodos de platina imersos no meio de cultura, tinham sua divisão celular inibida e apresentavam um crescimento filamentosos. Esse efeito foi posteriormente atribuído a presença de um produto da eletrólise dos eletrodos de platina, identificado como sendo a cis-diaminodicloroplatina. Alguns anos após, foram testados complexos de platina em modelos animais com tumor e os resultados foram promissores, o que levou ao início de experimentos em humanos (ROSENBERG, 1985).

Aprovado em 1979 pelo *American Food and Drug Administration* (FDA), o uso clínico da cDDP revolucionou o tratamento de certos tipos de tumores, especialmente do trato genitourinário (NISHIKAWA et al., 2001). Desde então, a cDDP é um dos agentes quimioterápicos mais utilizados no tratamento de muitas neoplasias humanas e de animais, principalmente nos tumores de testículo, de ovário, nos melanomas malignos, tumores de cabeça e pescoço e nos carcinomas da bexiga e do pulmão. No entanto, a sua utilidade clínica está limitada, devido ao surgimento de vários efeitos colaterais tais como: náuseas, vômitos, hipomagnesemia, mielosupressão, neurotoxicidade, ototoxicidade e principalmente nefrotoxicidade (CONKLIN, 2004; ÇETIN et al., 2006).

Estas toxicidades são dose-dependentes, limitando a terapia e a dose máxima tolerada. Para a cDDP, a dose máxima tolerada está entre 100 e 120 mg/m² por ciclo e deve ser administrada com pré- e pós-hidratação adequada (HARTMANN e LIPP, 2003)

A quimioterapia convencional para tratamento do câncer é baseada no uso de agentes citostático e/ou citotóxico agindo nos compostos e funções celulares que controlam o crescimento e divisão celular (POIRSON-BICHAT et al., 2000).

A princípio acreditava-se que a cDDP entraria nas células principalmente por difusão, porém estudos recentes relatam um transporte ativo pelo transportador de cobre Ctr1. Uma vez na corrente sanguínea, a cisplatina encontra-se ligada às proteínas plasmáticas numa proporção de 80 a 88%. Seu principal metabólito ativo, monoaquo-platina, reage com proteínas de baixo peso molecular e grupos sulfidríla, como a glutatona, cisteína e metionina e então com proteínas de elevado peso molecular como albumina e gamaglobulinas, através de ligações covalentes. Sua meia-vida plasmática é longa, aproximadamente 10 dias, sendo que a platina acumula-se progressivamente no plasma (ALI et al., 2008^a).

A presença de íons cloreto no plasma e nas células modula a reatividade da cisplatina *in vivo*. Uma vez no interior da célula, os íons cloreto da molécula de cDDP se dissociam da platina devido à baixa concentração intracelular desses íons (0,1 M no meio extracelular e 3 mM no meio intracelular) o que facilita esse processo. A substituição do cloreto pela água fornece uma molécula carregada positivamente, capaz de ligar-se a nucleófilos celulares do DNA, RNA e proteínas (Figura 03) (LIPPARD, 1987).

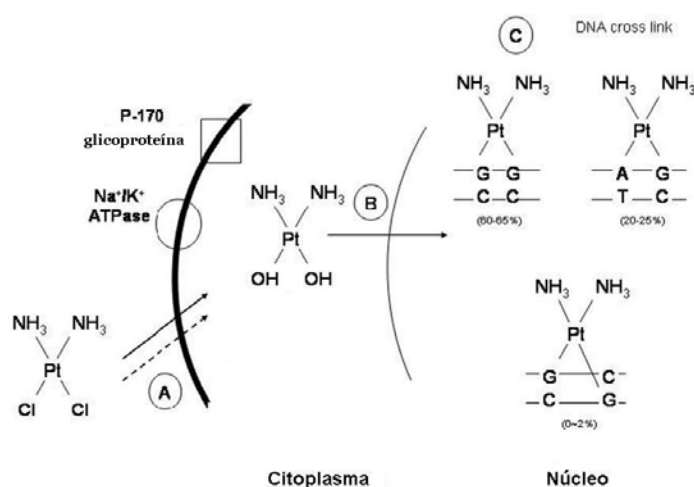


Figura 03. Via de ação da cisplatina na célula. A (meio extracelular), B (no citoplasma), C (no núcleo) (Adaptado e modificado de GUMINSKI, HARNETT, DEFAZIO, 2002)

O átomo de platina liga-se covalentemente à posição N⁷ das purinas formando ligações cruzadas 1,2 ou 1,3 intrafilamentares e ligações cruzadas interfilamentares. Essas ligações ao DNA ocorrem em substituição aos íons cloreto da molécula original de cDDP. Esses adutos DNA-cDDP causam várias repostas celulares tais como: inibição da replicação, inibição da transcrição, interrupção do ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose (Figura 04) (WANG e LIPPARD, 2005).

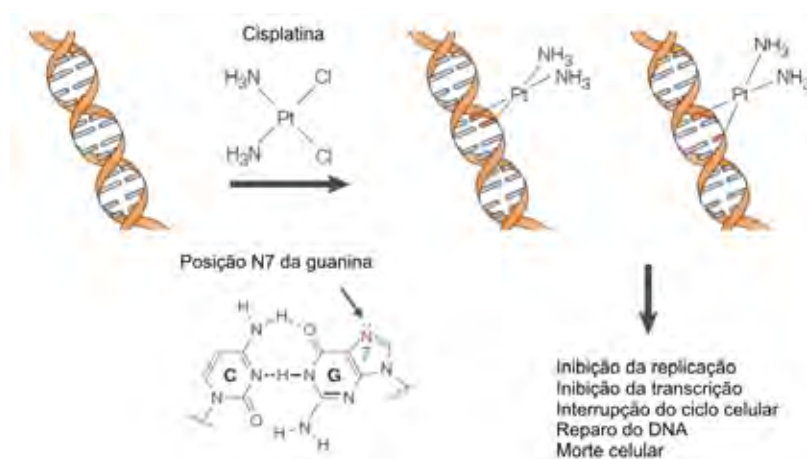


Figura 04. Formação e efeito dos adutos DNA-cDDP (adaptado e modificado de WANG e LIPPARD, 2005).

A cDDP acumula-se no fígado, baço e principalmente nos rins. O acúmulo renal deste fármaco provavelmente envolve a função excretora, pois a maior parte deste fármaco e/ou metabólitos é eliminada pela urina, de forma que nenhuma excreção ocorre pelas fezes (ALI et al., 2006).

O conceito de nefrotoxicidade abrange alterações renais funcionais e estruturais, decorrentes da ação de substâncias que exercem sua toxicidade no parênquima renal, seja por atingirem alta concentração ou porque o tecido possui características fisiológicas ou bioquímicas que os tornam mais susceptíveis ao fármaco. Embora constituam apenas 0,5% de toda massa corporal, os rins recebem cerca de 20-25% do fluxo sanguíneo cardíaco e conseqüentemente, qualquer fármaco que atinja a circulação sistêmica atingirá os rins em elevadas concentrações

(SAFIRSTEIN et al., 1981; ALI et al., 2006; PABLA e DONG, 2008). Esta nefrotoxicidade está possivelmente relacionada com sua recaptação preferencial pelas células do túbulo proximal, levando a concentrações intracelulares cinco vezes mais altas (SAFIRSTEIN et al., 1981).

A integridade funcional dos rins é vital para a homeostase corporal, uma vez que esses órgãos desempenham o papel principal na excreção de compostos resultantes do metabolismo e de xenobióticos, bem como na regulação do volume do fluido extracelular, composição eletrolítica e equilíbrio ácido-base. Cerca de 60-80% de todo o soluto e água filtrados no glomérulo são reabsorvidos no túbulo proximal. Agentes tóxicos que provocam danos ao túbulo proximal, com interrupção na produção de energia para os mecanismos ativos de transporte, ou alterações nas funções de enzimas e transportadores de membrana, afetam profundamente a função tubular proximal e conseqüentemente, o rim como um todo (HANIGAN et al., 2003).

O mecanismo pelo qual os compostos de platina induzem danos nas células renais ainda não está completamente esclarecido. Entretanto, a produção de ERs nas células tubulares dos rins tem sido considerada um processo patológico importante na nefrotoxicidade. O efeito antitumoral da cDDP e talvez sua nefrotoxicidade estão também relacionados aos metabólicos produzidos por hidrólise intracelular, capazes de alquilar bases de purina e pirimidina. Vários estudos sugerem que a nefrotoxicidade esteja vinculada à sua capacidade de inibir a síntese de DNA bem como funções de transporte (KOSMIDER et al., 2004; ÇETIN et al., 2006; ALI et al., 2008^a).

O rim é um alvo freqüente da ação de espécies reativas e intermediários altamente eletrofílicos gerados no metabolismo da maior parte dos fármacos

antineoplásicos, dentre eles a cDDP. Os mecanismos de disfunção renal induzida por quimioterápicos geralmente incluem danos renais vasculares ou estruturais. Alguns estudos demonstram que o comprometimento da função renal em sua fase inicial é marcado por graves modificações na hemodinâmica do órgão. Estas mudanças podem ser devidas, em parte, a efeitos vasculares reversíveis, mas os mais intrigantes aspectos da fase de iniciação são os danos celulares, particularmente, das células epiteliais tubulares, com conseqüentes distúrbios metabólicos que envolvem: depleção de ATP, acúmulo intracelular de cálcio, geração de espécies reativas de oxigênio, ativação da fosfolipase e alterações nos lipídios de membranas (SAFIRSTEIN et al., 1981; SADZUKA et al., 1992)

A administração de antioxidantes não parece interferir no efeito antitumoral dos antineoplásicos, pois estes fármacos eliminam as células cancerosas por meio de outros mecanismos celulares que não envolvem a ação das espécies reativas de oxigênio. Portanto, os antioxidantes da dieta poderiam atuar como quimioprotetores, prevenindo contra os efeitos colaterais das EROs, que podem causar danos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e o desenvolvimento de cânceres secundários, relacionados com as mutações induzidas pelo estresse oxidativo no DNA (ELSEENDOORN et al., 2001; ANTUNES et al., 2005).

A prevenção da nefrotoxicidade é considerada de grande importância clínica na quimioterapia com a cDDP. Para minimizar a toxicidade renal e permitir um escalonamento da dose, protocolos de hidratação e diurese são rotineiramente empregados, possibilitando uma redução da exposição renal ao fármaco, não só pela diluição do mesmo, mas também pela diminuição do tempo de trânsito pelos túbulos renais (HANIGAN et al., 2003, PABLA e DONG, 2008).

Além disso, muitos análogos de platina (carboplatina e oxaliplatina) têm sido sintetizados, e testados como agentes antineoplásicos na tentativa de superar as limitações do uso do fármaco, por outro lado, muitos agentes citoprotetores (seqüestradores de espécies reativas) também têm sido desenvolvidos para proteger as células saudáveis da ação tóxica da quimioterapia (ALI et al., 2006).

Uma proposta de terapia complementar recomendada para pacientes oncológicos durante o tratamento neoplásico citoreduzidor é o uso de antioxidantes. É aceito que os antioxidantes possam ser úteis na redução dos efeitos adversos da quimioterapia e radioterapia, por amenizar a toxicidade gerada pelos antitumorais (WEIJL et al., 1997; CONKLIN, 2004). Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de entender os efeitos da suplementação com micronutrientes na modulação dos danos induzidos pelo quimioterápico em células saudáveis. Alguns dos agentes antioxidantes relatados por prevenir ou atenuar a nefrotoxicidade da cDDP incluem o selênio, a vitamina E, a N-acetilcisteína, o lupeol, o kaempferol, a naringerina, a desferrioxamina, entre outros (ALI et al., 2006).

Segundo Souza et al. (2000) um agente citoprotetor ideal seria aquele capaz de permitir a intensificação da dose do quimioterápico, proteger um amplo espectro de órgãos e tecidos, conferir proteção específica aos tecidos normais, preservar o efeito anti-tumoral e ter pequena e/ou controlável toxicidade.

Evidências da literatura mostraram que a administração oral de vitamina C, do carotenóide bixina, do aminoácido glutamina ou do flavonóide quercetina, inibiram de forma significativa a peroxidação lipídica e a depleção de glutathione (GSH) renal induzidas pela cDDP (ANTUNES, et al., 2000; SILVA et al., 2001; MORA, et al., 2003). No entanto, a administração de curcumina e selenito de sódio não foram eficazes na manutenção das taxas de filtração glomerular, redução do peso

corpóreo e aumento do volume urinário (ANTUNES et al., 2001; CAMARGO et al, 2001; FRANCESCATO et al., 2004).

Çetin et al. (2006) verificaram o efeito da suplementação com alimentos naturais antioxidantes (uva preta adicionada na dieta e suco de tomate na água de beber) na nefrotoxicidade induzida pela cDDP em ratos. Os resultados demonstraram que a uva preta, alimento rico no flavonóide resveratrol, foi mais efetivo do que o suco de tomate, ao analisar os níveis das enzimas antioxidantes (CAT - catalase, SOD - superóxido dismutase, GSH-Px – glutathiona peroxidases e XO – xantina oxidase), produtos da peroxidação lipídica (MDA - malondialdeído) e danos histológicos.

1.4- Ratos Espontaneamente Hipertensos

O uso de modelos experimentais de hipertensão tem contribuído para o entendimento dos mecanismos envolvidos na elevação da pressão arterial e também no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes. Neste contexto, o modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR – *spontaneously hypertensive rats*) merece destaque (GOULDSBOROUGH et al., 2003).

Desenvolvido originalmente em 1963, a partir de endo-cruzamentos seletivos de ratos da cepa Wistar em Kyoto no Japão, este modelo é talvez o mais estudado na literatura (OKAMOTO e AOKI, 1963). A sua importância tem sido atribuída à similaridade da sua patogenia com a hipertensão arterial sistêmica (HAS) humana (TRIPPODO e FROHLICH, 1981).

Nesta cepa, assim como em humanos, o aumento da pressão arterial se dá de forma progressiva, e a hipertensão arterial se associa a outros fatores de risco,

como a hipertrofia ventricular esquerda, resistência à insulina, hipertrigliceridemia e intolerância à glicose (LERMAN et al., 2005).

Uma das prováveis causas do desenvolvimento de hipertensão arterial neste modelo decorre da estimulação do sistema nervoso simpático, ativado pela insulina e leptina, porém não se descarta a hipótese da hipertensão ser secundária ao aumento da produção de endotelina, hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, decréscimo da taxa de filtração glomerular, retenção de água e sódio, diminuição da síntese de óxido nítrico ou aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (GOULDSBOROUGH et al., 2003). Além disso, estudos sugerem que as ERs estejam envolvidas na patogênese da hipertensão pela ativação do sistema nervoso simpático central e periférico (MISHIMA et al., 2006).

Ademais, a maior geração de ERs é associada a uma disfunção dos mecanismos antioxidantes endógenos, além de afetar concomitantemente múltiplos órgãos e causar depleção de óxido nítrico (NO). Nos vasos, a depleção de NO causa vasoconstrição e disfunção endotelial e nos rins promovem reabsorção de sais, diminuição do fluxo sanguíneo e filtração glomerular, eventos que levarão ao dano tecidual (TOUYZ, 2004; LASSÈGUE, 2004).

Cabe ressaltar que a maior atividade adrenérgica e a hiperinsulinemia, na situação de resistência à insulina, têm papel sinérgico na retenção hidrossalina e aumento da resistência periférica total. A menor produção de NO e maior produção de endotelina, secundárias à hiperinsulinemia, também contribuem para a vasoconstrição dos SHRs (VASDEV et al., 2004; FERREIRA et al., 2005).

Os SHRs iniciam o desenvolvimento de HAS com aproximadamente cinco semanas de idade, apresentando níveis tensionais considerados hipertensivos entre a 7ª e a 15ª semanas, atingindo um platô entre a 20ª e a 28ª semanas. A partir desta

idade a hipertensão se estabiliza até aproximadamente um a 1,5 anos de idade quando os animais começam a desenvolver um quadro de insuficiência cardíaca congestiva, a qual é associada com uma elevada taxa de mortalidade (YAMORI, 1984).

Outra característica dos animais SHR é a hiperatividade do sistema renina angiotensina, principalmente em nível tecidual, a qual resulta em produção aumentada de angiotensina II em vários leitos vasculares, o que seguramente também contribui para a elevada resistência periférica total observada neste modelo (MULLINS et al., 2006).

Dadas as características deste modelo e a sua similaridade com a hipertensão humana, estratégias terapêuticas anti-hipertensivas são normalmente estudadas nos SHR. Nos últimos anos, novas modalidades terapêuticas principalmente baseadas em manipulação gênica (terapia gênica) e adição de compostos da dieta, têm sido intensamente estudadas em inúmeras doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial (PHILLIPS, 2001).

1.5 – Modelos de avaliação da genotoxicidade

Os testes de genética toxicológica são componentes básicos da avaliação de segurança pré-clínica de novas substâncias candidatas a fármacos, os quais têm o propósito de identificar compostos que possuem risco potencial de carcinogenicidade e mutagenicidade. Os testes de genotoxicidade são comumente conduzidos nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos candidatos a fármacos por serem comparativamente de menor duração, relativamente de baixo

custo e fornecendo informações sobre substâncias potencialmente carcinogênicas nos estágios iniciais do desenvolvimento dos novos fármacos (WITTE et al., 2007).

Como citado anteriormente, a cDDP tem efeitos genotóxicos e estes danos são encontrados nos pacientes mesmo depois de muitos meses e anos do final da quimioterapia (ELSEENDOORN et al., 2001). O acúmulo destas mutações podem levar ao desenvolvimento de cânceres secundários e instabilidade genômica. Além disso, algumas substâncias presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos, carcinogênicos ou antimutagênicos, isto é, podem induzir mutações no DNA e/ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores, enquanto outras podem atenuar ou anular estes efeitos (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991). Desta forma, tanto os quimioterápicos, quanto os possíveis antioxidantes ou alimentos empregados na proteção dos tecidos saudáveis, devem ser avaliados quanto à capacidade de indução de mutações (ANTUNES et al., 2005).

Ribeiro (2003) define mutação como uma mudança na sequência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. Os agentes que mudam a sequência do DNA são tóxicos para o gene e são chamados, portanto, de genotóxicos.

Existem três níveis de mutações: as mutações gênicas, as aberrações cromossômicas estruturais e as aberrações cromossômicas em número, como as aneuploidias, estas causadas por agentes aneugênicos e que surgem devido a perdas cromossômicas (número anormal de cromossomos) e defeitos na citocinese (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

Há uma clara relação entre mutagênese, teratogênese e carcinogênese. Uma mudança no material genético (mutação) pode ocasionar graves mudanças morfológicas, portanto, tornando-se teratogênica; e a mutação pode também ser o

evento desencadeador do processo que leva ao câncer, portanto, tornando-se carcinogênica (SALZANO, 2002).

Agentes clastogênicos, que induzem quebras cromossômicas, ou agentes aneugênicos, que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição eqüitativa dos cromossomos durante a divisão celular, podem ser detectados, em uma primeira abordagem, pelo Teste do Micronúcleo, realizado *in vivo*. As substâncias a serem testadas são geralmente administradas a roedores e o efeito é verificado em esfregaços da medula óssea. O ensaio serve como um primeiro passo no estudo de compostos mutagênicos, tendo a vantagem de ser mais rápido que a análise de aberrações cromossômicas (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1976).

O ensaio *in vivo* do micronúcleo (MN) em mamíferos é particularmente relevante para a avaliação dos perigos mutagênicos, uma vez que permite a avaliação dos elementos metabólicos, da farmacocinética e dos processos de reparo do DNA *in vivo*, embora estes possam variar de espécie para espécie, de tecido para tecido e em termos do alvo genético final (KAYANE e PARRY, 2008).

O micronúcleo se expressa em células em divisão, como um resultado de quebras cromossômicas, formando um fragmento acêntrico, ou como consequência de cromossomos inteiros que estão atrasados e não se prenderam ao fuso de divisão, que dessa forma chegam aos pólos das células durante a mitose ou a meiose. Na telófase, estes fragmentos ou cromossomos inteiros são encapsulados em um pequeno núcleo separado, daí o termo micronúcleo. Assim, o micronúcleo representa tanto uma alteração cromossômica estrutural como uma alteração numérica (KAYANE e PARRY, 2008).

Os micronúcleos são tipicamente arredondados, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito e correspondem ao que se denomina, em hematologia, de

Corpúsculo de Howell-Jolly. A taxa espontânea de eritrócitos policromáticos com micronúcleo é baixa e consiste em cerca de 3 por 1000 (FENECH et al., 1999).

Durante a maturação das células da linhagem eritrocitária na medula óssea, o núcleo principal é expelido do eritrócito nucleado, enquanto os micronúcleos ficam retidos. Estes pequenos núcleos são analisados principalmente em eritrócitos policromáticos (PCEs, eritrócitos jovens). O Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é bastante usado para a detecção de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e aneugênicos, que interferem nas fibras do fuso. O teste caracteriza pela observação do efeito do agente testado em eritrócito policromáticos anucleados, que têm vida curta, e qualquer micronúcleo encontrado representa dano cromossômico recente. Por ser de fácil identificação e ter distribuição bem definida, os resultados obtidos com o teste fornecem fortes evidências da mutagenicidade sistêmica do composto químico avaliado sob condições experimentais apropriadas (FENECH et al., 1999).

A versão alcalina do Ensaio do Cometa vem sendo proposta para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. O teste é utilizado para detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferente das mutações, as lesões detectadas por este teste são passíveis de reparo. Desta maneira, o teste pode também ser utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (GONTIJO e TICE, 2003).

Essa técnica foi introduzida em 1988 por Singh e colaboradores, que modificaram outras técnicas de eletroforese em microgel. O Ensaio do Cometa envolve a lise das células gerando os nucleóides compostos de DNA nuclear. Os

nucleóides são submetidos a uma eletroforese que causa a migração do DNA danificado para fora do núcleo em direção ao ânodo formando o cometa, que na cabeça contém o DNA que não foi danificado e cauda contendo a porção de DNA que sofreu danos. Desse modo, as células com maior dano ao DNA apresentaram maior quantidade de DNA na cauda (ALMEIDA et al., 2006).

Sob certas condições o ensaio também pode detectar ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína, que na ausência de outros tipos de lesões ao DNA resultam em uma relativa diminuição na migração do DNA comparado com os controles negativos, devido à capacidade das ligações cruzadas de estabilizar a molécula de DNA (WITTE et al., 2007).

Considerando-se a importância da cisplatina como fármaco antineoplásico efetivo e as limitações devidas à sua nefrotoxicidade e genotoxicidade e sabendo-se que o acúmulo intracelular de espécies reativas é um dos mecanismos envolvidos no dano oxidativo no tecido renal, a polpa de maracujá amarelo com sua suposta atividade antioxidante poderia proporcionar uma redução destes efeitos. Além disso, não são relatados estudos demonstrando um possível efeito protetor deste fruto sobre os danos nefrotóxicos imediatos, danos genotóxicos e sobre a modulação da pressão arterial em modelo de ratos SHR, quando utilizados são muito úteis na avaliação de aspectos fisiopatogênicos, fisiopatológicos e terapêuticos.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Verificar os efeitos genotóxicos e nefrotóxicos imediatos (24 horas) da administração de cDDP (5mg/Kg p.c., dose única) e o possível efeito protetor de doses diárias da polpa de maracujá amarelo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar normotensos.

2.2- Objetivos Específicos

Determinar os níveis de creatinina plasmática e urinária, proteinúria, volume de urina e verificar sua relação com os efeitos nefrotóxicos imediatos provocados pela cisplatina;

Avaliar o efeito da polpa de maracujá amarelo sob os níveis de peroxidação lipídica renal, através das determinações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) e de glutathione, 24 horas após a injeção intraperitoneal;

Verificar possíveis alterações na pressão arterial sistólica dos animais SHR, após a administração da polpa de maracujá;

Avaliar o efeito da mutagenicidade e genotoxicidade induzida pela cDDP pela técnica do Micronúcleo em células da medula óssea dos ratos e Ensaio do Cometa *in vivo*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

Polpa de maracujá amarelo

A polpa de maracujá amarelo congelada (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) foi gentilmente doada pela Indústria e Comércio de Frutas Ricaeli Ltda. (Cabreúva/SP). Todas as polpas doadas foram do mesmo lote e segundo o fabricante apresentam a seguinte composição nutricional (Figura 05).

Informação Nutricional • Porção de 200ml (6 colheres de sopa)		
	Quantidade por porção	%VD(*)
Valor Calórico	45 kcal / 189 kJ	2 %
Carboidratos	8,0 g	3 %
Proteínas	1,3 g	2 %
Gorduras Totais	1,3 g	2 %
Sódio	18 mg	1 %
Não contém quantidade significativa de Gordura Saturada, Gordura Trans e Fibra Alimentar.		

*Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades.

Figura 05. Informação nutricional da polpa de maracujá amarelo integral (Fonte Indústria Ricaeli).

A polpa de maracujá amarelo utilizada neste trabalho foi avaliada por HPLC-PDA-MS/MS (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de diodo - Anexo 02 e Anexo 03) na Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, pelo grupo da Prof^a Dr^a. Adriana Zerlotti Mercadante, para caracterização e identificação da quantidade de carotenóides totais, fenólicos totais, flavonóides totais e ácido ascórbico, como parte dos objetivos do projeto temático “Avaliação integrada da estabilidade e propriedades funcionais de pigmentos naturais de alimentos” (Processo FAPESP N°. 05/59552-6).

3.1.1- Planejamento Experimental

O projeto de pesquisa, contendo informações pertinentes aos objetivos e métodos do trabalho, foi submetido à apreciação e aprovação (protocolo nº 06.1.994.53.4 – Anexo 04) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) e obedeceu aos preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2003).

Os experimentos foram realizados no biotério dos Laboratórios de Bromatologia e Nutrição e Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da USP. Foram utilizados 50 ratos machos da espécie *Ratus norvegicus* da linhagem SHR, com peso médio entre 280-350 gramas, idade $\geq$ 16 semanas, provenientes do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, com a supervisão do Prof Dr Eduardo Barbosa Coelho. Os outros 14 ratos Wistar normotensos, com peso médio de 200 gramas, foram provenientes do biotério Central da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto-USP.

Durante a pesquisa, os animais foram mantidos em caixas de polietileno, com cama tipo maravalha-serragem de madeira; ambiente com controle de temperatura ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$), com ciclo de 12 h, claro/escuro. Aos animais foram fornecidos água e ração comercial (*ad libitum*). A água em bebedouros e a ração padrão para roedores, em formato de peletes, Nuvital® (Anexo 01) da empresa Nuvilab CR1, Curitiba/PR-Brasil, em comedouros localizados nas tampas.

Todos os ensaios foram conduzidos após um período de adaptação e os animais mantidos em caixas de contenção com número máximo de 4, até 24 h antes do sacrifício, quando foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais com a finalidade de coletar a urina de 24 horas. Para obtenção da dose correta

administrada relativo ao peso corpóreo, cada animal foi pesado antes da gavagem ou da injeção e o volume das soluções ajustados adequadamente.

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada no primeiro e no quarto dia do experimento, no laboratório de Farmacologia do Departamento de Físico-Química da FCFRP-USP.

As três doses da polpa de maracujá foram administradas por sondagem oro-gástrica (gavagem), método escolhido por se assemelhar à via oral de consumo humano e porque garante a administração da dose (volume) desejada.

Os animais foram divididos em 10 grupos (n=6/7), sendo quatro grupos controles e seis grupos tratados com a polpa, que receberam os seguintes tratamentos durante os seis dias experimentais (Figura 06).

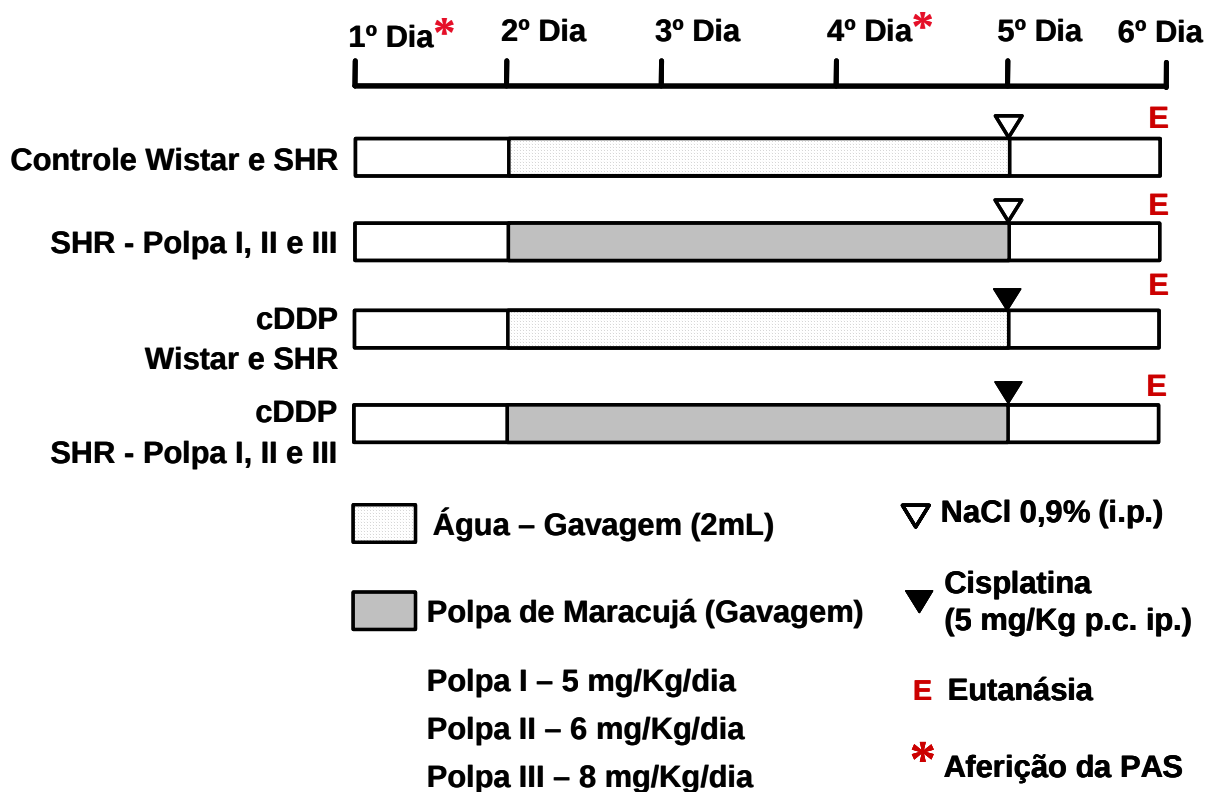


Figura 06. Esquema simplificado do planejamento experimental.

Grupos Controle – SHR e Wistar (n=6/7): Administração de água por gavagem, seguida de uma injeção intraperitoneal de solução salina (NaCl 0,9 %).

Grupos SHR Polpa de Maracujá I, II e III (n=6): Administração da polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia respectivamente) por gavagem, seguida de uma injeção intraperitoneal de solução salina (NaCl 0,9 %).

Grupos Cisplatina – SHR e Wistar (n=7): Administração de água por gavagem, seguida de uma injeção i.p. de cisplatina (5 mg/Kg).

Grupos SHR Polpa de Maracujá I, II e III + Cisplatina (n=6/7): Administração da polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia respectivamente) por gavagem, seguida de uma injeção i.p. de cisplatina (5 mg/Kg).

As injeções intraperitoneais foram em dose única. Os tratamentos por gavagem foram realizados em quatro doses (72, 48, 24 horas e 1 hora antes da injeção).

Nos ensaios utilizou-se o fármaco Platinil® - solução injetável (Cisplatina Laboratório Quiral Química do Brasil, Juiz de Fora/MG CAS nº 15663-27-1) e os demais reagentes foram de grau analítico.

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (10%) e posteriormente decapitados, a urina e sangue coletados, rins, fígado e medula óssea foram retirados para análises, conforme descrito a seguir:

Rins: Foram retirados, eliminando-se o excesso de líquido com papel absorvente e pesado em balança digital Micronal B 600. Posteriormente foram utilizados para preparar o homogenato a 10 % em solução de cloreto de potássio 1,15% gelada, onde foram avaliados os níveis de peroxidação lipídica por determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) dentre elas, o malondialdeído (MDA). Esse mesmo homogenato foi utilizado para a determinação

dos níveis de glutathiona (GSH) e proteína tecidual. Parte do tecido renal (~0,4 g) foi utilizada para realização do ensaio do cometa.

Fígado: Foram retirados, eliminando-se o excesso de líquido com papel absorvente e pesado em balança digital Micronal B 600. Uma alíquota do órgão (~0,4 g) foi utilizada para realização do ensaio do cometa.

Urina: Coletada em provetas graduadas utilizando-se gaiolas metabólicas que permitiram a separação da urina e das fezes. Uma alíquota da amostra foi utilizada para a determinação dos níveis de creatinina;

Plasma: Após a eutanásia, coletou-se o sangue em tubo com EDTA com auxílio de funil. Logo em seguida, foi centrifugado e o plasma separado para subsequente determinação dos níveis de creatinina plasmática.

Medula óssea: Após o período experimental, os animais foram decapitados e as epífises distais dos fêmures foram cortadas.

3.2- Métodos

3.2.2-Avaliação da função renal

A função renal foi avaliada nos animais após 24 horas da administração do antitumoral por meio dos seguintes parâmetros:

3.2.2.1- Determinação dos níveis de creatinina plasmática e urinária

Utilizou-se o Kit Labtest® (Diagnóstica® S.A.), método colorimétrico que consiste na reação da creatinina com o picrato alcalino em meio tamponado, com prévia desproteinização em ácido pícrico, obtendo-se um cromógeno cuja leitura foi realizada em comprimento de onda de 510 nm em espectrofotômetro Micronal-digital

modelo B342II. Os resultados foram expressos em mg de creatinina a cada 100 ml de plasma ou urina.

3.2.2.2- Determinação da proteinúria

A urina coletada nas últimas 24 horas antes do sacrifício foi utilizada para dosagem e proteína urinária segundo o método descrito por BRADFORD (1976). Os resultados foram expressos em mg de proteína/24 horas.

3.2.2.3- Determinação do volume urinário

O volume urinário dos animais foi calculado através do volume de urina coletado em provetas graduadas, durante as 24 horas antes do sacrifício, sendo os valores expressos em mililitro de urina por 24 horas (mL/24h).

3.2.2.4- Relação peso rins e fígado/peso corpóreo

Para melhor avaliar o peso dos rins e fígado, calculou-se a proporção entre o peso dos órgãos em relação ao peso corpóreo, sendo os resultados expressos em porcentagem (%).

3.2.2.5- Determinação dos níveis de glutathiona renal

Os níveis de GSH nos rins dos ratos foram determinados pelo método de Sedlak e Lindsay (1968) no mesmo homogenato a 10 % em KCl, preparado para a determinação das SRATB. Uma alíquota de 300 µl foi diluída em água para 1,0 ml. Fez-se a desproteinização pela adição de 100 µl de uma solução de ácido tricloroacético (1,0mg/ml), e em seguida a centrifugação. O sobrenadante foi utilizado para o teste. Em um tubo com 2,0 ml de tampão Tris 400 nmol –EDTA 20

nmol – HCL pH 8,9 coloca-se 500 µl do sobrenadantes e 100 µl de 5,5' – ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DNTB), que é reduzido pelos grupos sulfidril (SH) e forma 1 mol de 2-nitro-5-ácido mercaptobenzóico por mol de SH. Este tem uma cor amarela intensa e pode ser utilizado para medir grupos SH. Foi utilizado a L-cisteína como padrão e as determinações foram realizadas em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.2.2.6- Determinação dos níveis de proteína tecidual

Os níveis de proteína tecidual foram determinados para poder expressar os resultados dos níveis de GSH. Assim, 50 µL do homogenato a 10% foi diluído 1:25 em água destilada. Em seguida, 200 µL desta solução diluída foram colocados em um tubo contendo 800 µL de água destilada e realizando a determinação segundo o método descrito por Hartree (1972). Para realização da curva padrão, utilizou-se albumina bovina 1 mg/ml.

3.2.2.7- Determinação do malondialdeído tecidual

O método para avaliação de peroxidação lipídica por determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) dentre elas, o malondialdeído (MDA) foi o preconizado por Uchiyama e Mihara (1978). O rim direito foi extraído (mantido em gelo picado), cortado em pedaços pequenos e pesado cuidadosamente 0,25g, aos quais, eram, então adicionados 5,0 ml de solução gelada de KCl 1,15%, para obtenção de um homogenato a 5%. Pipetados 0,5 ml do homogenato em 3,0 ml de solução de ácido fosfórico 1% e 1,0 ml de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA)

0,6%. O TBA reage com as SRATB e com o malondialdeído (MDA) (numa proporção de duas moléculas de TBA para cada MDA), resultando coloração rosa estável. A mistura foi aquecida por 45 minutos em banho de água fervente e após resfriamento da solução, foram adicionados 4 ml de *n*-butanol e centrifugado. As soluções padrão de 1,1',3,3'-tetrametoxipropano, foi utilizada nas concentrações de 5,125; 10,250 e 20,500 nmol por ml. As medidas de absorbância da fase orgânica foram feitas em dois comprimentos de onda (520 e 535 nm) utilizando-se um espectrofotômetro digital modelo Genesis. A diferença entre as absorbâncias correspondia ao valor de TBA livre. Os resultados das concentrações de malondialdeído foram expressos em nmol /g de tecido úmido de rim.

3.2.3 –Aferição da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida duas vezes durante o período experimental (dia 1 e dia 4). Através de um sistema não invasivo, a partir de pletismografia da artéria da cauda, seguindo metodologia descrita por Vianna et al. (1992).

3.2.4-Avaliação da toxicidade genética

3.2.4.1- Técnica do Micronúcleo em células da medula óssea

A técnica utilizada para o estudo de micronúcleos em células de medula óssea foi descrita por Ribeiro (2003), com algumas adaptações ao laboratório.

Coleta: Após o período experimental, os animais foram decapitados e as epífises distais dos fêmures das patas traseiras foram cortadas. A medula óssea foi retirada dos fêmures, com o auxílio de uma seringa contendo 1 mL de soro bovino

fetal (temperatura ambiente), e o material foi colocado dentro de um tubo de centrifuga contendo mais 1 mL do soro. O material foi homogeneizado com o auxílio de pipeta Pasteur e centrifugado por 10 minutos a 800 rpm e uma parte do sobrenadante foi descartada. O “pellet” foi ressuspensionado no restante do sobrenadante (em torno de 0,3 mL).

Preparo das lâminas: Uma gota de suspensão da medula óssea foi colocada em uma das extremidades de uma lâmina de vidro limpa e seca fazendo-se um esfregão com o auxílio de uma lamínula de vidro. Após 24 horas as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos. Após 24 horas da fixação, as lâminas foram coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,06M e KH_2PO_4 0,06M – pH 6,8), na proporção de 1 mL do corante para 20 mL da solução tampão, por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada, secas ao ar e em seguida acondicionadas até a análise.

Análise citológica das lâminas: Para cada animal foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs). As lâminas foram codificadas e analisadas em teste cego, utilizando microscópio de luz, em objetiva de 40X (Figura 07). A análise dos micronúcleos (MN) foi feita seguindo os critérios descritos por Salamone (1980) e Titenko-Holland et al. (1997):

- a) micronúcleos não podem ser refringentes;
- b) micronúcleos devem estar no mesmo plano da célula;
- c) micronúcleos devem sempre apresentar forma arredondada.

Análise da relação entre eritrócitos policromáticos/normocromáticos (PCE/NCE): Nesta avaliação foram analisados 500 eritrócitos, sendo estabelecida a relação entre o número de PCE/NCE em 500 células. Esta análise pode fornecer

indícios de que substância administrada está diminuindo a produção de novos eritrócitos (policromáticos). Se isto ocorrer, a droga poderá ser considerada citotóxica (GOLLAPUDI e MCFADDEN, 1995). Considera-se eritrócito policromático, um eritrócito imaturo, em um estágio intermediário de desenvolvimento, que ainda contém ribossomos e, portanto pode ser distinguido do eritrócito normocromático (eritrócito maduro) por coloração seletiva para ribossomos (RIBEIRO et al., 2003).

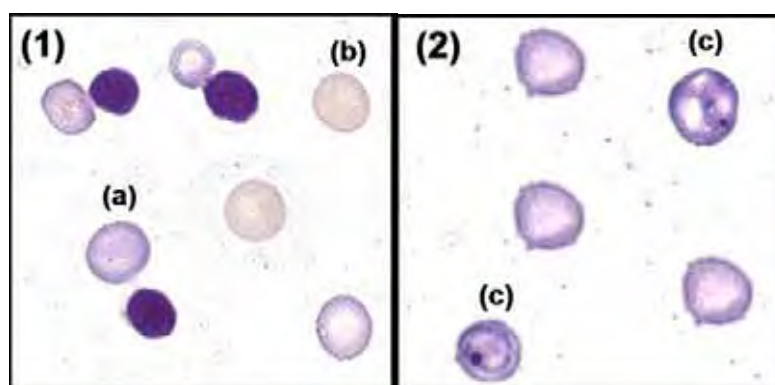


Figura 07. Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos e normocromático de medula óssea de ratos. Aumento original 1000x (imersão), coloração Giemsa. Fonte: Laboratório de Bromatologia e Nutrição e Nutrigenômica, USP – 2008.

(1) (a) Eritrócito policromático (PCE)

(b) Eritrócito normocromático (NCE)

(2) (c) Eritrócito policromático micronucleado (PCEMN)

3.2.4.2- Ensaio de eletroforese em gel de célula única *in vivo* (Ensaio do Cometa)

Isolamento e Viabilidade Celular:

O Ensaio do Cometa foi realizado no rim e fígado seguindo o método descrito por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000). Durante o processamento das amostras, estas foram mantidas em gelo, protegidas da luz direta e processadas imediatamente à eutanásia. Células isoladas foram obtidas a partir do órgão que foram picotados em 1 mL de solução de Hanks. Determinou-se a proporção de células viáveis no homogenato pela técnica de exclusão por azul de tripan 0,4%. Este é um método para determinar a viabilidade em células isoladas sugerido por Burlinson et al. (2007). As células foram analisadas somente quando a viabilidade observada for superior a 70%.

Preparo das Lâminas:

Após o isolamento das células, adicionou-se solução de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) na proporção de 1:4, e transferiu 80µL da mistura para uma lâmina convencional pré-coberta com agarose 1,5%, cobrindo-a com uma lamínula (24 x 60 mm). As lâminas foram mantidas em repouso por 10 minutos a 4° C para solidificação da agarose. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, DMSO 10%, Triton X-100 1%, pH 10) por 20-22h a 4°C. Em seguida, transferiram-se as lâminas por 20 minutos para tampão alcalino (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13, 4°C), para permitir o desenrolamento do DNA e a expressão de quebras de fita simples e sítios álcali lábeis. A eletroforese horizontal foi realizada a 25 V e 300 mA (0,74V/cm) durante 20 minutos, usando o tampão alcalino de eletroforese (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH > 13, 4 °C). Todas estas etapas foram

conduzidas sem a presença de luz direta, para inibir a ocorrência de quebras adicionais ao DNA. Após a eletroforese, neutralizou-se as lâminas com solução de neutralização (Tris 0,4M, pH 7,5 a 4° C) por 5 minutos. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, fixadas em etanol absoluto por 2 minutos, e após estarem secas, foram armazenadas a temperatura ambiente.

Coloração e análise:

A análise das lâminas foi realizada imediatamente após a coloração, da seguinte maneira:

- Pingou-se 20µl de solução de brometo de etídio (20µg/mL) sobre a lâmina;
- Cobriu-se cuidadosamente com uma lamínula 24 x 60mm;
- A análise das lâminas foi realizada imediatamente após a coloração, usando microscópio de epifluorescência (filtro 516-560nm, barreira de filtro de 590nm, objetiva de 40x). Marca ZEISS®, modelo Axiostar plus - HBO 50.

Foram analisados 100 nucleóides por animal, sendo 50 por lâmina, visto que estas lâminas foram codificadas e analisadas em teste cego. Recomendações de *Guidelines* Internacionais consideram que o escore visual é um método de análise bem válido, na medida em que haja uma padronização dos escores em cada laboratório (TICE et al., 2000).

Para análise visual dos cometas (Figura 08), o comprimento da cauda em relação ao diâmetro da cabeça, foi utilizado para classificar os nucleóides:

Classe 0 = sem cauda

Classe 1 = cauda com um comprimento menor que o diâmetro da cabeça do cometa

Classe 2 = cauda com um comprimento entre 1 e 2 vezes o diâmetro da cabeça do cometa

Classe 3 = cauda com um comprimento maior que 2 vezes o diâmetro da cabeça do cometa

Classe 4 = cauda com extenso comprimento e cabeça com pequeno diâmetro.

Cometas sem cabeça foram excluídos da análise, pois podem representar células mortas, apesar do teste de viabilidade celular realizado previamente, antes do procedimento do Ensaio do Cometa (Da SILVA et al., 2000).

O escore de dano no DNA foi obtido pela multiplicação do número de células em cada classe pelo dano da classe, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Escore Total} = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$$

Onde n representa o número de células em cada classe (0, 1, 2, 3 e 4). Portanto, o escore de dano no DNA pode variar de 0 a 400 (Da SILVA et al., 2000).

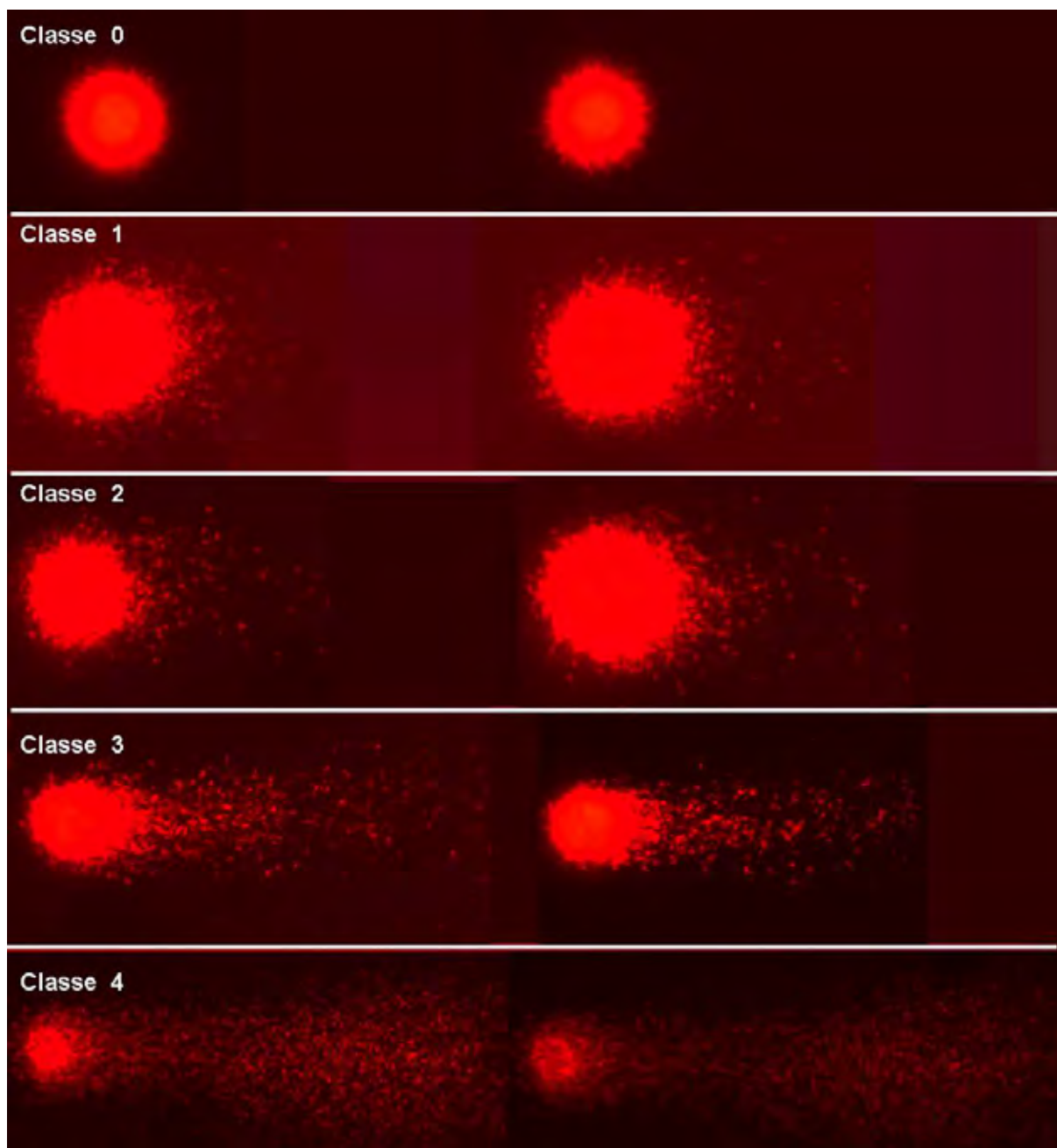


Figura 08. Fotomicrografia de nucleóides de células hepáticas, coradas com brometo de etídio (20µg/mL) e observados em microscópio de epifluorescência (filtro 516-560nm, barreira de filtro de 590nm), (0) nucleóide sem dano, (1), (2), (3) e (4) nucleóides apresentando vários níveis de danos. Aumento original 400x. Fonte: Laboratório de Bromatologia e Nutrição e Nutrigenômica, USP – 2008.

3.3- Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Programa GraphPad Prism, versão 3.0 para Windows, GraphPad Software® (San Diego, Califórnia, USA), empregando o teste de Análise Múltiplas das Variâncias (ANOVA) com pós teste de Newman Keuls. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

O peso corpóreo dos animais está apresentado na Figura 09. Em relação ao peso inicial (dia 1) e no final do experimento (dia 6), nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos experimentais ($p>0,05$).

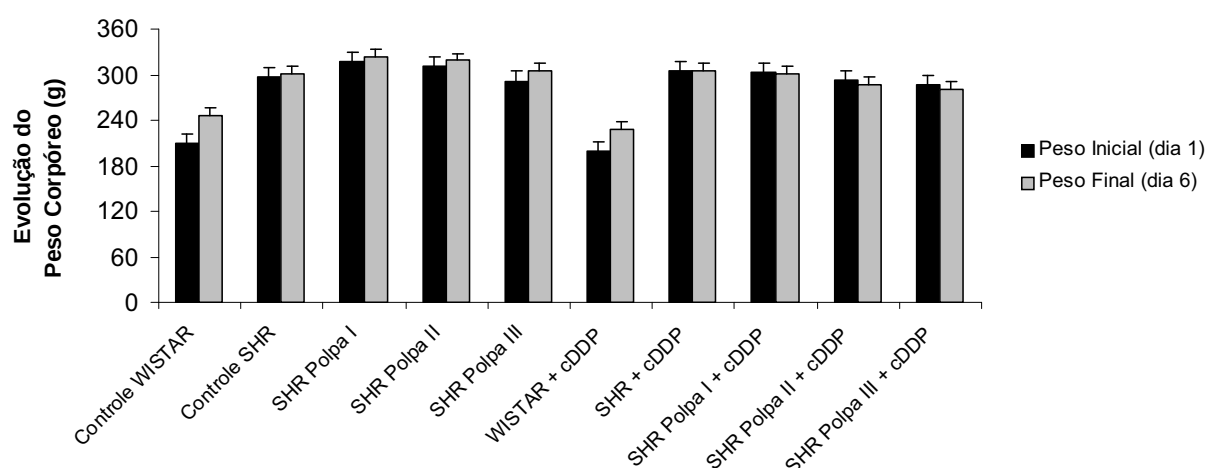


Figura 09. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia, gavagem - doses múltiplas) sobre a evolução do peso corpóreo (gramas) em ratos sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com salina (NaCl 0,9%) ou cisplatina (cDDP) 5 mg/Kg. Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6/7$). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls.

Quando os sinais de nefrotoxicidade são avaliados pelo peso dos rins em relação ao peso corpóreo do animal, visualiza-se na Tabela 01 que não houve diferença estatística nos grupos experimentais, o mesmo observado para a relação do peso do fígado.

Ao analisar a função renal (Tabela 01), é possível observar que não houve diferença estatística entre os valores de creatinina plasmática e proteinúria, entre todos os grupos experimentais. No entanto, observa-se que a administração do fármaco apresentou uma tendência em diminuir a proteinúria dos ratos Wistar em relação ao seu grupo controle negativo.

O volume urinário (mL/24h) do Grupo SHR + cDDP demonstrou ser maior quando comparado ao grupo Controle SHR, no entanto, não apresentou diferença estatística. Os grupos tratados com o antitumoral (SHR Polpa I + cDDP e SHR Polpa II + cDDP) apresentaram diferença estatística em relação ao grupo SHR + cDDP. Salienta-se que os ratos SHR (controles negativos) apresentam maior volume urinário quando comparados aos ratos Wistar, devido às características da linhagem dos animais.

Assim, foi possível observar que o tratamento subagudo com a polpa de maracujá amarelo não alterou a função renal dos ratos tratados 24 horas após a administração da cisplatina.

Tabela 01. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia, gavagem - doses múltiplas) na relação peso órgão/peso corpóreo e sobre níveis de creatinina plasmática (mg/dL), proteinúria (mg/24h) e volume urinário (mL/24h) em ratos sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg

PARÂMETRO	UNIDADE	GRUPOS										
		Controle		SHR	SHR	SHR	WISTAR	SHR	SHR Polpa I	SHR Polpa II	SHR Polpa III	
		WISTAR	SHR	Polpa I	Polpa II	Polpa III	+ cDDP	+ cDDP	+ cDDP	+ cDDP	+ cDDP	
Média		(n=7)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=7)	(n=6)	(n=6)
± DP												
Peso rim/peso	%	0,86 ± 0,05	0,80 ± 0,04	0,81 ± 0,04	0,85 ± 0,07	0,78 ± 0,06	0,85 ± 0,05	0,80 ± 0,08	0,80 ± 0,05	0,78 ± 0,04	0,74 ± 0,06	
Peso fígado/peso	%	4,58 ± 0,01	3,79 ± 0,22	3,77 ± 0,39	3,72 ± 0,33	4,08 ± 0,30	4,09 ± 0,49	3,57 ± 0,2	3,32 ± 0,28	3,45 ± 0,23	3,60 ± 0,24	
Creatinina Sérica	mg/dL	0,94 ± 0,32	1,32 ± 0,29	1,74 ± 0,31	1,64 ± 0,20	1,02 ± 0,28	0,94 ± 0,30	1,30 ± 0,38	1,12 ± 0,26	1,28 ± 0,30	1,50 ± 0,49	
Proteinúria	mg/24h	8,03 ± 1,85	5,76 ± 0,70	6,25 ± 2,33	6,73 ± 1,99	7,48 ± 3,18	3,23 ± 1,63	5,03 ± 4,57	9,40 ± 2,69	9,21 ± 4,55	5,24 ± 4,75	
Fluxo Urinário	ml/24h	8,79 ± 2,87	14,83 ± 2,93	17,25 ± 5,21	15,50 ± 8,34	14,33 ± 7,37	17,00 ± 15,65	26,29 ± 1,80	7,92 ^b ± 3,38	9,40 ^b ± 12,02	19,00 ± 16,83	

Cada valor corresponde a média ± desvio padrão (n = 6/7). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^b p < 0,05 em relação ao Controle SHR.

Os valores de glutathiona reduzida (GSH) renal estão representados na Figura 10. Observou-se que os grupos Wistar (controle positivo e negativo) apresentam níveis de GSH maiores quando comparados aos grupos SHR controles.

Já os grupos SHR tratados com a polpa de maracujá amarelo (SHR Polpa II e SHR Polpa III) apresentam uma tendência no aumento dos níveis de glutathiona, verificando que a maior dose apresentou diferença estatística em relação ao Controle SHR.

Os grupos tratados com o antitumoral (WISTAR + cDDP, SHR + cDDP e SHR Polpa I + cDDP) apresentaram uma redução quando comparados ao Controle WISTAR. Já os grupos SHR Polpa II + cDDP e SHR Polpa III + cDDP apresentaram diferença estatística em relação ao grupo Controle WISTAR e SHR, SHR + cDDP e WISTAR + cDDP, demonstrando um possível efeito protetor da polpa, ao promoverem aumento dos níveis de glutathiona renal.

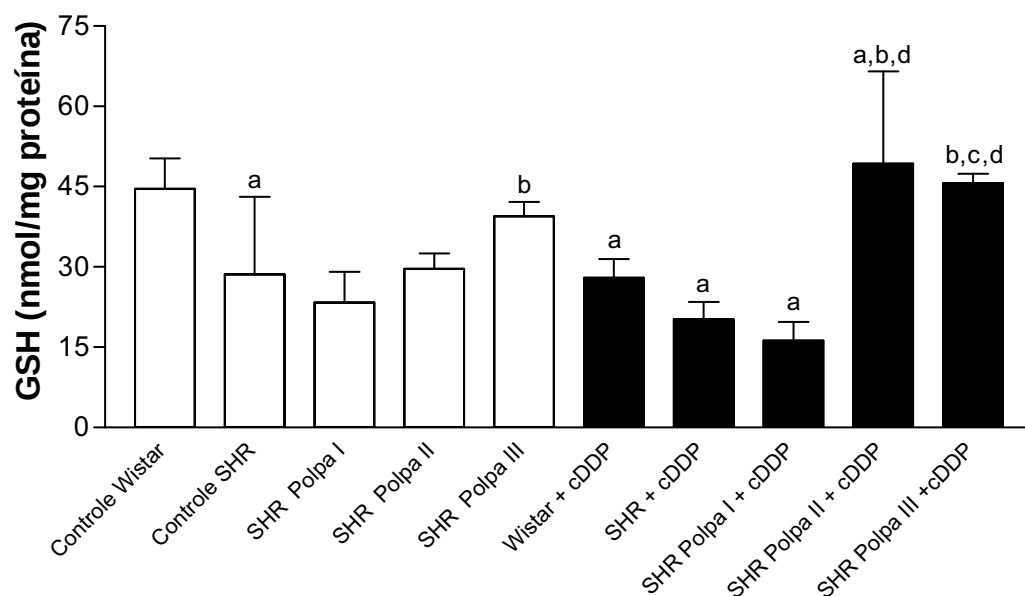


Figura 10. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia, gavagem - doses múltiplas) sobre níveis renais de glutathiona (nmol/mg proteína) em ratos sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP). Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6/7$). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a $p < 0,05$ em relação ao Controle Wistar; ^b $p < 0,05$ em relação ao Controle SHR; ^c $p < 0,05$ em relação ao Wistar + cDDP; ^d $p < 0,05$ em relação ao SHR + cDDP.

A peroxidação lipídica foi estimada por meio da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, pela dosagem de malondialdeído (MDA) tecidual. Na Figura 11 estão apresentados os valores renais de MDA dos animais sacrificados após 24 horas do tratamento intraperitoneal.

Nos grupos tratados com a polpa de maracujá amarelo (três doses) não se observou alteração dos valores de MDA em relação aos grupos controles. Observa-se um aumento dos valores do grupo SHR + cDDP e SHR Polpa I + cDDP em relação ao grupo Controle Wistar e SHR. Mas, nas associações das maiores doses da polpa com o antitumoral (SHR Polpa II + cDDP e SHR Polpa III + cDDP) verifica-se uma tendência de redução dos valores, quando comparados ao Controle SHR + cDDP.

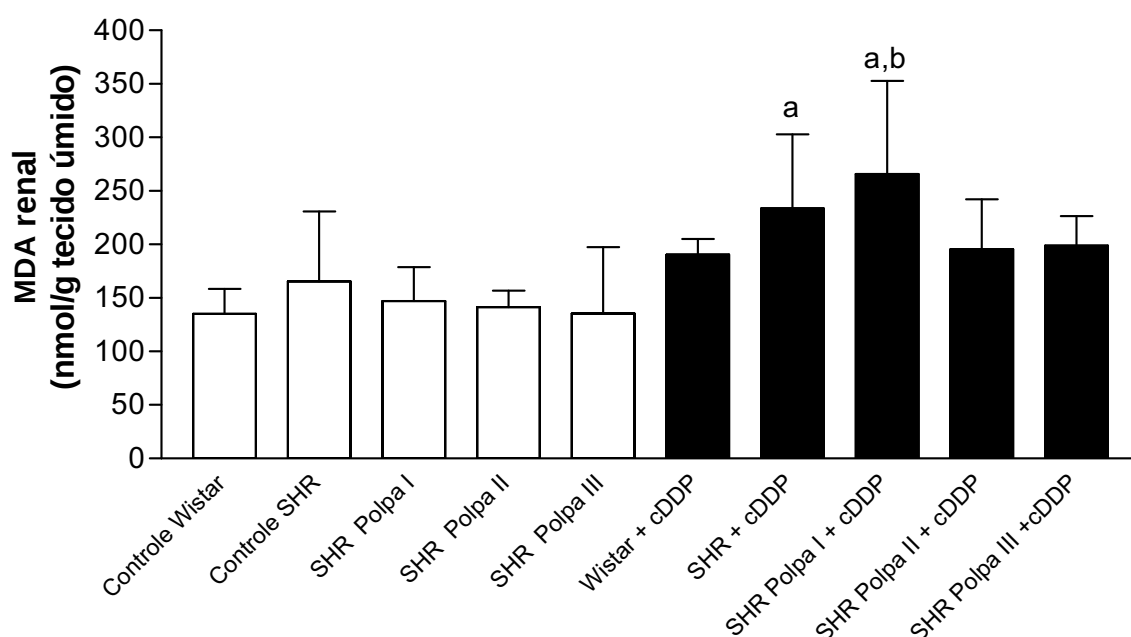


Figura 11. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia gavagem - doses múltiplas) sobre níveis renais de MDA (nmol/g tecido) em ratos sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina 5 mg/Kg (cDDP). Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6/7$). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a $p < 0,05$ em relação ao Controle Wistar; ^b $p < 0,05$ em relação ao Controle SHR.

A aferição da pressão arterial sistólica, representada na Figura 12, foi realizada antes (dia 1) e após (dia 4) ao tratamento com as múltiplas doses da polpa de maracujá.

No primeiro dia de aferição todos os grupos SHR apresentaram diferença estatística em relação aos Grupos Controles Wistar (positivo e negativo), devido às características da linhagem dos ratos hipertensos.

No dia 4, observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos SHR controle (positivo e negativo). Todas as associações com o antitumoral (SHR Polpa I + cDDP, SHR Polpa II + cDDP e SHR Polpa III + cDDP) foram capazes de reduzir a pressão arterial em relação ao grupo SHR + cDDP. Sendo que, das três doses analisadas, a Polpa II e III mostraram ser as mais eficientes na redução da pressão arterial, quando comparadas aos controles SHR ($p < 0,05$).

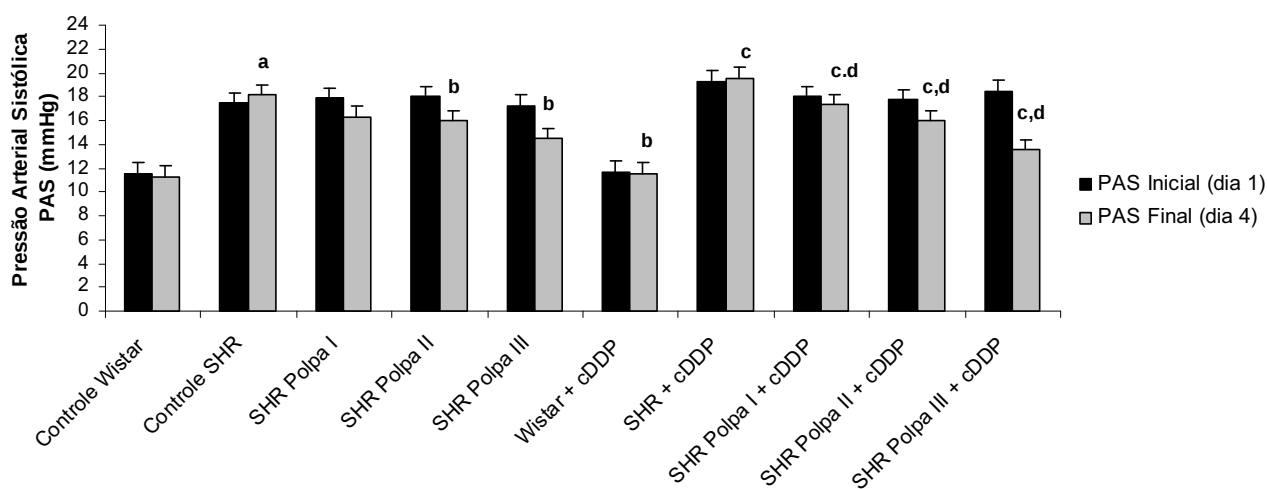


Figura 12. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia gavagem - doses múltiplas) sobre a pressão arterial sistólica, PAS (mmHg) em ratos sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg. Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6/7$). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a $p < 0,05$ em relação ao Controle WISTAR; ^b $p < 0,05$ em relação ao Controle SHR; ^c $p < 0,05$ em relação ao Wistar + cDDP ; ^d $p < 0,05$ em relação ao SHR + cDDP.

A cisplatina administrada intraperitonealmente como agente indutor de danos, na concentração de 5mg/Kg p.c., acarretou um aumento no número médio de PCE micronucleados quando comparado aos grupos controles negativos (Controle WISTAR e SHR). Salienta-se ainda que a mutagenicidade induzida pela cisplatina observada pela frequência média de MNs foi maior nos ratos SHR em relação aos ratos Wistar. Nota-se também que os grupos que receberam as maiores doses da polpa (SHR Polpa II e III) apresentaram menor número de PCE micronucleados quando comparados ao Controle SHR (Tabela 02).

A Tabela 02 mostra que o número de eritrócitos policromáticos, em relação aos normocromáticos (PCE/NCE), a cada 500 células analisadas por animal, não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo. Esses dados mostram que as polpas, nas doses administradas não afetaram a multiplicação celular dos eritrócitos e, portanto, não se mostraram citotóxicas quando administrado aos animais.

Tabela 02. Frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos em 2000 células analisadas por animal (n=6/7) em cada tratamento, para avaliar os efeitos de três diferentes doses de polpa de maracujá amarelo e respectivos controles sobre a mutagenicidade induzida pela cisplatina

GRUPOS/RATOS	Número de MNs em 2000 PCE							Total MNs por tratamento	PCE MNs (Média ± DP)	PCE/NCE (Média ± DP)
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7			
Controle Wistar (n=7)	3	3	3	3	2	0	3	17	2,83 ± 0,41	1,28 ± 0,29
Controle SHR (n=6)	3	4	6	3	4	2	0	22	3,67 ± 1,37	1,38 ± 0,22
SHR Polpa I (n=6)	3	3	5	3	4	3	0	21	3,50 ± 0,84	1,28 ± 0,17
SHR Polpa II (n=6)	1	4	1	3	3	2	0	14	2,33 ± 1,21	1,3 ± 0,11
SHR Polpa III (n=6)	1	2	3	4	3	2	0	15	2,5 ± 1,49	1,27 ± 0,35
Controle Wistar + cDDP (n=7)	10	8	7	9	9	8	3	54	7,71 ± 2,29 ^{a,b}	1,24 ± 0,14
Controle SHR + cDDP (n=7)	13	10	12	8	9	5	10	67	9,57 ± 2,64 ^{a,b}	1,25 ± 0,29
SHR Polpa I + cDDP (n=6)	10	14	10	8	9	5	0	56	9,33 ± 2,94 ^{a,b}	1,15 ± 0,21
SHR Polpa II + cDDP (n=7)	11	7	9	5	8	6	7	53	7,57 ± 1,99 ^{a,b}	1,23 ± 1,04
SHR Polpa III + cDDP (n=6)	3	7	8	6	6	10	0	40	6,67 ± 2,34 ^{a,b}	1,14 ± 0,29

Cada valor corresponde a média ± desvio padrão (n = 6/7). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle Wistar; ^b p < 0,05 em relação ao Controle SHR.

Os dados das tabelas 3 e 4 mostram os efeitos sobre a migração do DNA em suspensões celulares do fígado e do rim dos animais, 24 h após a injeção intraperitoneal de salina ou cisplatina.

Os dados mostram que as três concentrações da polpa de maracujá amarelo (SHR Polpa I, II e III) não induziram danos graves ao DNA em relação ao controle negativo. Sendo que a maioria dos nucleóides encontram-se nas classes 0, 1 e 2 (Figura 13).

A cDDP, utilizada como controle positivo, induziu um aumento mais evidente na migração do DNA nas células renais, quando comparados às células hepáticas. Salienta-se que em ambos os tecidos, houve predominância de nucleóides nas classes 0, 1 e 2. Pois, a cisplatina não é um bom indutor de danos recomendado para o Ensaio do Cometa, devido à produção de ligações cruzadas que interferem na migração do DNA (Figura 13).

Ao comparar as diferentes linhagens de animais, controles Wistar e SHR (positivo e negativo), observou-se diferença estatística, entre os grupos, fato este também observado em outros parâmetros anteriormente analisados, como glutathione e pressão arterial, devido às características genéticas das diferentes linhagens de animais.

Tabela 03. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia gavagem - doses múltiplas) sobre a detecção de danos ao DNA utilizando o Ensaio do Cometa, em 100 células hepáticas por ratos (n=6/7), sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina (cDDP) 5mg/Kg

TRATAMENTOS	Ratos	Classes do Cometa					Total *	Escore
		0	1	2	3	4		
Controle WISTAR	R 1	60	30	6	4	0	40	54
	R 2	63	30	7	0	0	37	44
	R 3	42	36	15	4	3	58	90
	R 4	47	36	12	5	0	53	75
	R 5	54	35	18	3	0	56	80
	R 6	74	19	4	3	0	26	36
	R 7	73	16	10	1	0	27	39
Média		59,00	28,86	10,29	2,86	0,43	42,43	59,71
± DP		12,22	8,21	5,06	1,77	1,13	13,43	21,73
Controle SHR	R 1	58	35	6	1	0	42	50
	R 2	65	26	7	1	0	34	43
	R 3	26	47	23	2	2	74	107
	R 4	6	7	26	53	8	94	250
	R 5	4	8	43	40	5	96	234
	R 6	15	37	24	20	4	85	161
Média		29,00	26,67	21,50	19,50	3,17	70,83	140,83 ^a
± DP		26,44	16,28	13,72	22,51	3,13	26,72	89,41
SHR + Polpa I	R 1	40	25	29	5	1	60	102
	R 2	9	13	26	49	3	91	224
	R 3	16	72	10	2	0	84	98
	R 4	19	65	14	1	0	80	96
	R 5	63	30	7	0	0	37	44
	R 6	38	48	11	3	0	62	79
Média		30,83	42,17	16,17	10,00	0,67	69,00	107,17
± DP		20,03	23,40	9,11	19,18	1,21	19,92	61,10
SHR + Polpa II	R 1	29	52	19	0	0	71	90
	R 2	26	47	23	2	2	74	107
	R 3	27	25	29	17	2	73	142
	R 4	54	35	18	3	0	56	80
	R 5	25	25	46	3	0	74	126
	R 6	42	36	15	4	3	58	90
Média		33,83	36,67	25,00	4,83	1,17	67,67	105,83
± DP		11,69	11,11	11,37	6,11	1,33	8,36	24,02
SHR + Polpa III	R 1	18	34	46	2	0	82	132
	R 2	32	37	27	4	0	68	103
	R 3	26	15	51	6	2	74	143
	R 4	35	54	10	2	0	66	80
	R 5	87	13	0	0	0	13	13
	R 6	34	52	14	0	0	66	80
Média		38,67	34,17	24,67	2,33	0,33	61,50	91,83
± DP		24,51	17,52	20,45	2,34	0,82	24,54	46,59

Tabela 03 (continuação)

TRATAMENTOS	Ratos	Classes do Cometa					Total	Escore
		0	1	2	3	4		
WISTAR + cDDP	R 1	53	37	8	2	0	47	59
	R 2	61	25	11	3	0	39	56
	R 3	54	40	6	0	0	46	52
	R 4	70	24	5	1	0	30	37
	R 5	64	30	6	0	0	36	42
	R 6	52	45	3	0	0	48	51
	R 7	71	27	2	0	0	29	31
Média		60,71	32,57	5,86	0,86	0,00	39,29	46,86 ^b
± DP		7,99	8,14	3,02	1,21	0,00	7,99	10,38
SHR + cDDP	R 1	29	28	32	11	0	71	125
	R 2	53	22	23	1	1	47	75
	R 3	35	31	27	7	0	65	106
	R 4	39	53	8	0	0	61	69
	R 5	38	33	20	6	3	62	103
	R 6	54	41	7	0	0	48	55
	R 7	37	22	38	2	1	63	108
Média		40,71	32,86	22,14	3,86	0,71	59,57	91,57 ^c
± DP		9,32	11,07	11,60	4,22	1,11	8,87	25,32
SHR Polpa I + cDDP	R 1	42	36	15	4	3	58	90
	R 2	34	52	14	0	0	66	80
	R 3	18	50	31	1	0	82	115
	R 4	27	25	29	17	2	73	142
	R 5	26	47	23	2	2	74	107
	R 6	26	15	51	6	2	74	143
Média		28,83	37,50	27,17	5,00	1,50	71,17	112,83
± DP		8,21	14,98	13,60	6,26	1,22	8,21	26,07
SHR Polpa II + cDDP	R 1	18	35	46	1	0	82	130
	R 2	16	23	56	4	0	83	147
	R 3	18	50	31	1	0	82	115
	R 4	53	24	22	3	0	49	77
	R 5	25	42	26	6	1	75	116
	R 6	36	42	16	5	1	64	93
	R 7	54	38	7	1	0	46	55
Média		31,43	36,29	29,14	3,00	0,29	68,71	104,71
± DP		16,51	9,88	16,99	2,08	0,49	15,93	31,72
SHR Polpa III + cDDP	R 1	27	37	36	0	0	73	109
	R 2	16	10	58	18	1	87	184
	R 3	19	22	55	3	1	81	145
	R 4	40	38	21	1	0	60	83
	R 5	83	13	3	1	0	17	22
	R 6	25	63	10	1	1	75	90
Média		35,00	30,50	30,50	4,00	0,50	65,50	105,50
± DP		24,94	19,77	23,04	6,93	0,55	25,42	55,59

Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6/7$). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls.

^a $p < 0,05$ em relação ao Controle WISTAR;

^b $p < 0,05$ em relação ao grupo SHR;

^c $p < 0,05$ em relação ao grupo WISTAR + cDDP;

* Total de números de nucléoides com dano (classe 1+2+3+4)

Escore Total = $(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$

Tabela 04. Efeito do pré-tratamento com polpa de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia gavagem - doses múltiplas) sobre a detecção de danos ao DNA utilizando o Ensaio do Cometa, em 100 células renais por ratos (n=6/7), sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina 5mg/Kg

TRATAMENTOS	Ratos	Classes do Cometa					Total *	Escore
		0	1	2	3	4		
Controle WISTAR	R 1	47	36	12	5	0	53	75
	R 2	19	65	14	2	0	81	99
	R 3	34	39	17	10	0	66	103
	R 4	39	53	8	0	0	61	69
	R 5	26	65	6	2	1	74	87
	R 6	29	61	8	2	0	71	83
	R 7	48	47	3	2	0	52	59
Média		34,57	52,29	9,71	3,29	0,14	65,43	82,14
± DP		10,81	12,04	4,86	3,30	0,38	10,81	15,83
Controle SHR	R 1	18	10	27	38	7	82	206
	R 2	25	53	21	1	0	75	98
	R 3	12	12	67	6	3	88	176
	R 4	47	36	16	1	0	53	71
	R 5	35	48	28	0	0	76	104
	R 6	37	47	15	1	0	63	80
Média		29,00	34,33	29,00	7,83	1,67	72,83	122,50 ^a
± DP		13,04	18,92	19,38	14,93	2,88	12,80	55,20
SHR + Polpa I	R 1	25	52	29	3	0	84	119
	R 2	18	50	31	1	0	82	115
	R 3	26	42	22	10	0	74	116
	R 4	28	39	33	0	0	72	105
	R 5	25	42	26	6	1	75	116
	R 6	11	15	40	29	5	89	202
Média		22,17	40,00	30,17	8,17	1,00	79,33	128,83
± DP		6,43	13,25	6,18	10,83	2,00	6,68	36,16
SHR + Polpa II	R 1	32	40	28	0	0	68	96
	R 2	33	39	23	5	0	67	100
	R 3	23	37	30	8	2	77	129
	R 4	25	25	46	3	0	74	126
	R 5	32	37	27	4	0	68	103
	R 6	16	72	10	2	0	84	98
Média		26,83	41,67	27,33	3,67	0,33	73,00	108,67
± DP		6,74	15,82	11,62	2,73	0,82	6,69	14,80
SHR + Polpa III	R 1	25	42	26	6	1	75	116
	R 2	40	38	21	1	0	60	83
	R 3	18	28	24	30	0	82	166
	R 4	16	72	10	2	0	84	98
	R 5	25	63	10	1	1	75	90
	R 6	25	25	46	4	0	75	129
Média		24,83	44,67	22,83	7,33	0,33	75,17	113,67
± DP		8,42	18,97	13,27	11,27	0,52	8,42	30,74

Tabela 04 (continuação)

TRATAMENTOS	Ratos	Classes do Cometa					Total	Escore
		0	1	2	3	4		
WISTAR + cDDP	R 1	38	33	20	6	3	62	103
	R 2	40	54	5	2	0	61	70
	R 3	55	39	5	1	0	45	52
	R 4	35	47	15	3	0	65	86
	R 5	23	37	31	7	2	77	128
	R 6	49	45	5	1	0	51	58
	R 7	35	51	14	0	0	65	79
Média		39,29	43,71	13,57	2,86	0,71	60,86	82,29
± DP		10,37	7,67	9,73	2,67	1,25	10,37	26,46
SHR + cDDP	R 1	14	45	25	16	0	86	143
	R 2	11	20	32	34	3	89	198
	R 3	27	17	46	7	3	73	142
	R 4	27	43	23	5	2	73	112
	R 5	23	27	33	15	2	77	146
	R 6	18	41	34	6	1	82	131
	R 7	15	36	43	4	2	85	142
Média		19,29	32,71	33,71	12,43	1,86	80,71	144,86 ^{a,c}
± DP		6,45	11,38	8,48	10,66	1,07	6,45	26,19
SHR Polpa I + cDDP	R 1	24	46	30	0	0	76	106
	R 2	15	25	19	0	0	44	63
	R 3	18	27	33	22	0	82	159
	R 4	25	52	21	2	0	75	100
	R 5	32	37	27	4	0	68	103
	R 6	19	33	30	18	0	81	147
Média		22,17	36,67	26,67	7,67	0,00	71,00	113,00
± DP		6,11	10,63	5,54	9,75	0,00	14,14	34,90
SHR Polpa II + cDDP	R 1	18	50	31	1	0	82	115
	R 2	32	60	28	0	0	88	116
	R 3	17	32	45	4	2	83	142
	R 4	26	47	23	2	2	74	107
	R 5	9	10	27	4	0	41	76
	R 6	24	24	43	9	0	76	137
	R 7	26	50	19	7	0	76	109
Média		21,71	39,00	30,86	3,86	0,57	74,29	114,57
± DP		7,59	17,62	9,77	3,24	0,98	15,48	21,73
SHR Polpa III + cDDP	R 1	26	47	23	2	2	74	107
	R 2	25	42	26	6	1	75	116
	R 3	16	31	47	4	2	84	145
	R 4	15	38	40	6	1	85	140
	R 5	35	31	27	7	0	65	106
	R 6	6	18	22	3	1	44	75
Média		20,50	34,50	30,83	4,67	1,17	71,17	114,83
± DP		10,21	10,21	10,23	1,97	0,75	15,20	25,58

Cada valor corresponde a média $\pm$ desvio padrão ($n = 6/7$). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls.

^a $p < 0,05$ em relação ao Controle WISTAR;

^b $p < 0,05$ em relação ao grupo SHR;

^c $p < 0,05$ em relação ao grupo WISTAR + cDDP;

* Total de números de nucléoides com dano (classe 1+2+3+4)

Escore Total = $(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$

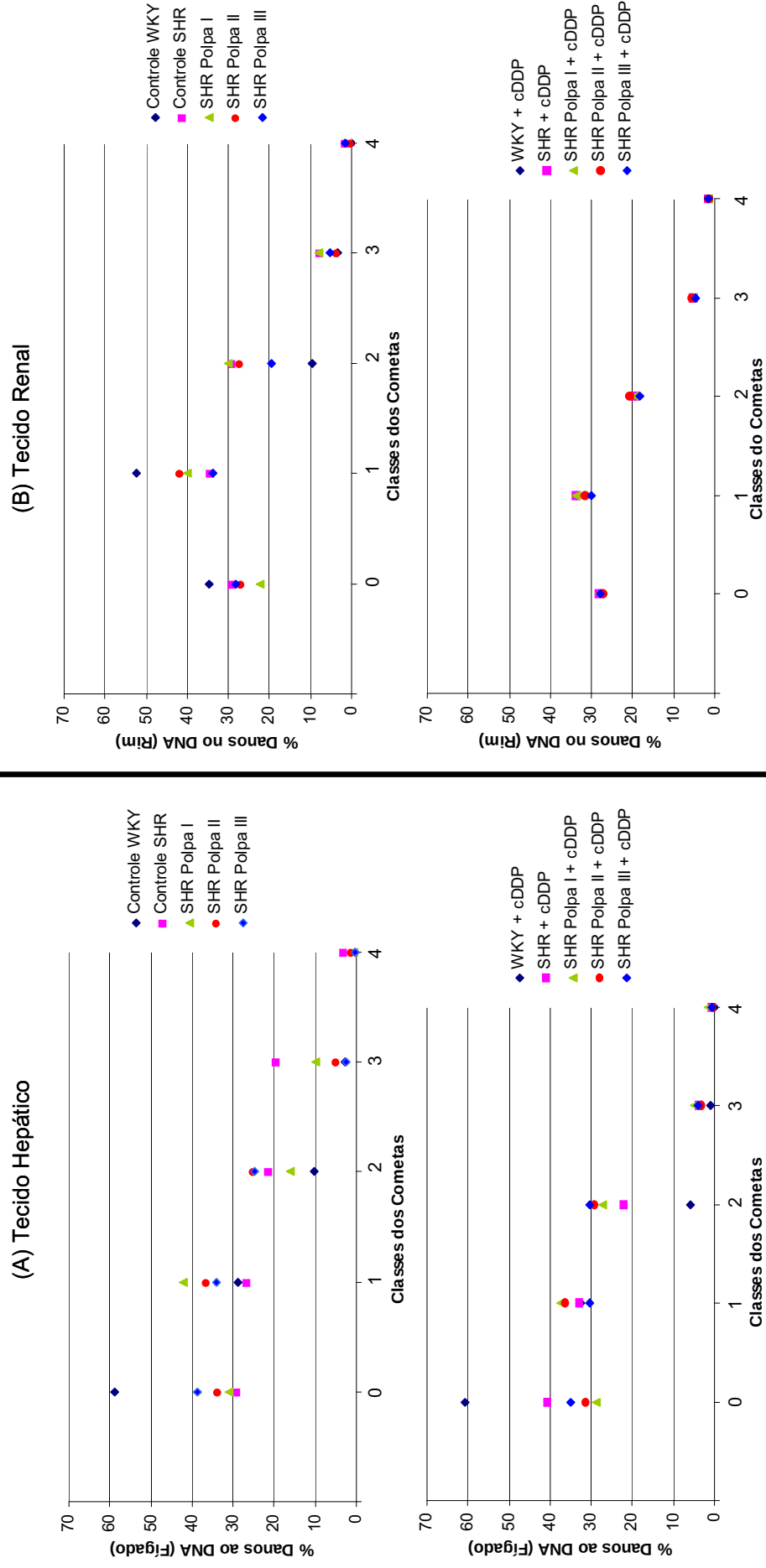


Figura 13. Distribuição das Classes dos Cometas de acordo com a % de Danos ao DNA, avaliados pelo Ensaio do Cometa, (A) Tecido Hepático e (B) Tecido Renal, para avaliar os efeitos de três doses de maracujá amarelo (5, 6 e 8 mg/Kg/dia gavagem - doses múltiplas) sobre a genotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos SHR e Wistar sacrificados 24 horas após receberem o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% ou cisplatina 5mg/Kg.

5- DISCUSSÃO

Este trabalho levantou a hipótese que a nefrotoxicidade e genotoxicidade induzida pela cisplatina possa ser resultante, ao menos em parte, do estresse oxidativo. Desta maneira, uma substância antioxidante capaz de neutralizar a ação das espécies reativas de oxigênio formadas durante o tratamento quimioterápico, resultaria na redução da ação tóxica da cisplatina sobre as células saudáveis.

Apesar do seu potencial nefrotóxico e citotóxico, a cisplatina ainda é considerada um fármaco importante no tratamento de diversos tipos de tumores malignos, incluindo câncer de ovário, testículo, bexiga, cabeça e pescoço, pulmão, colo de útero e endométrio (BAEK et al., 2003; PABLA e DONG, 2008). A nefrotoxicidade é um efeito adverso comum de certos medicamentos antineoplásicos e constitui a maior preocupação no tratamento com a cDDP, limitando a sua utilidade no tratamento antitumoral (PABLA e DONG, 2008).

O rim não é somente o responsável pela excreção do fármaco, mas é também o seu principal local de acúmulo (ALI et al, 2008^a). Assim, para verificar os danos renais induzidos pela cisplatina, os animais foram tratados com dose única deste antitumoral (5mg/Kg p.c.) que não provoca morte. Apesar de ser uma dose frequentemente utilizada em roedores, de acordo com vários outros autores (ANTUNES et al., 2000; FRANCESCATO et al, 2004; MORA et al., 2003; AMARAL et al., 2008), ela é aproximadamente quatro a cinco vezes maior do que a empregada em seres humanos (JACOBS et al., 1980). Salienta-se que, em geral, animais de laboratório são mais resistentes aos fármacos do que outras espécies. A injeção intraperitoneal é a via de administração mais utilizada em experimentos

devida à sua simplicidade e também porque possibilita maximizar a exposição de agentes (THIEL et al., 1976).

Na literatura não há um consenso quanto à administração de polpa de maracujá amarelo administrada em ratos. A escolha da dose foi baseada nos estudos de Çetin et al. (2006), que avaliaram o potencial de sucos naturais (uva e tomate) frente à nefrotoxicidade induzida pela cDDP e Rojas et al. (2006) que administraram suco de *Passiflora edulis* liofilizado (500 mg/Kg/dia, via oral) em ensaio *in vivo*.

É conhecido que a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos Wistar resultam em: aumento do volume urinário, aumento relativo do peso dos rins, aumento dos níveis de creatinina plasmática e redução no “clearance” de creatinina (ANTUNES et al., 2000, 2001; FRANCESCATO et al., 2004; SILVA et al., 2001, ALI et al., 2008^a).

O tempo estabelecido para realização do experimento, 24 horas após a injeção intraperitoneal da cDDP, foi selecionado para avaliar os efeitos genotóxicos (Técnica do Micronúcleo e Ensaio do Cometa) e os efeitos nefrotóxicos imediatos.

Evidências da literatura indicam que os ratos SHR quando comparados aos ratos Wistar normotensos (WISTAR), apresentam maior produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, entre elas o MDA, acompanhados da redução de GSH tecidual e atividade reduzida das enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT, GSH-Px e GSH redutase); eventos observados principalmente no tecido renal. Este dano tecidual resulta em maior excreção de proteínas, diminuição do fluxo sanguíneo e filtração glomerular (ZUHAIR et al., 2000; LASSEÈGUE, 2004).

Khan et al. (2007) utilizando como modelo experimental ratos WKY e ratos SHR após 7 dias da administração de cisplatina (5mg/Kg p.c.), observaram redução

do fluxo sanguíneo renal, redução do *clearance* de creatinina, aumento da excreção de sódio e destruição dos túbulos renais. Estes danos renais agudos foram mais evidentes nos ratos SHR, quando comparados aos WKY, indicando maiores danos na estrutura tubular e aumento da resistência vascular renal. No entanto, não foi observada diferença estatística na aferição da pressão arterial após a administração do fármaco, fato que também foi observado no presente estudo, indicando que o fármaco não influencia na aferição da pressão arterial.

A cDDP tem os rins como o alvo principal dos seus efeitos tóxicos e altera completamente as suas funções normais, podendo estabelecer uma insuficiência renal aguda, decorrente das lesões provocadas nas células dos túbulos renais. Essas lesões são responsáveis pela diminuição da taxa de filtração glomerular, fazendo com que haja acúmulo no plasma dos produtos gerados no metabolismo de nitrogênio, representado pelo aumento dos níveis de nitrogênio não protéico (nitrogênio uréico no sangue) e da creatinina, substância endógena resultante da degradação da creatina muscular. Assim, a concentração plasmática de creatinina é bastante estável, variando menos de 10% ao longo do dia em indivíduos normais. Um aumento dos níveis de creatinina sérica reflete danos renais irreversíveis, esta se encontra aumentada sempre que a razão de filtração glomerular estiver baixa, devido à doença renal ou à obstrução pós-renal (ALI et al., 2008^b).

Sabe-se que a creatinina plasmática é um parâmetro convencional para determinar a função renal (VERPLANKE et al., 1994). O pico máximo de elevação ocorre após quatro ou cinco dias do tratamento com cDDP (FATIMA et al., 2004). Segundo BALDEW et al. (1991), o pico de creatinina para ratos ocorre 5 dias após uma dose única de cisplatina (6mg/Kg). NISHIKAWA et al. (2001) também evidenciam níveis de creatinina aumentados, com pico no 5º dia após a

administração do fármaco, sugerindo a ocorrência de dano renal. ALI et al. (2008^a) observaram em ratos, seis dias após a injeção intraperitoneal do fármaco, aumento da creatinina, uréia, concentração de proteína e atividade da N-acetil- β -D glicosaminidase, seguida da diminuição da osmolalidade.

Fatos estes que justificam as alterações não significativas dos parâmetros de creatinina plasmática do presente estudo, pois este parâmetro bioquímico foi avaliado 24 horas após a injeção intraperitoneal do fármaco, com o propósito de detecção de danos precoces nos rins dos animais.

A poliúria é uma característica proeminente da toxicidade renal induzida pela cisplatina, e ocorre em duas fases distintas. A primeira fase ocorre quando a taxa de filtração glomerular ainda é normal (um a dois dias após a dose única) e pode ser revertida pela administração de vasopressina, sugerindo uma liberação prejudicada deste hormônio pela glândula pituitária (CLIFTON et al., 1982). A segunda ocorre quando a taxa de filtração glomerular está baixa (cinco a seis dias após dose única) e é resistente à administração de vasopressina (GORDON et al., 1982; SAFIRSTEIN et al., 1981).

A cisplatina interfere com o metabolismo da água, através da hipófise, dificultando a liberação do hormônio antidiurético. Tal fato ocorre um dia após o seu uso. No entanto, no oitavo dia, existe uma diminuição da resposta a este hormônio nas células renais, tornando-as resistentes (LITTERST et al., 1985).

No presente estudo, observou-se que os animais que receberam a administração de cisplatina apresentaram uma tendência no aumento no fluxo urinário, e que o tratamento com a polpa de maracujá amarelo foi parcialmente efetivo em atenuar este aumento. O aumento do volume urinário observado em ratos tratados com cisplatina também foi observado em investigações anteriores

(DAUGAARD, 1990; ANTUNES et al., 2000; FRANCESCATO et al, 2004; MORA et al., 2003; AMARAL et al., 2008, ALI et al., 2008^a), evidenciando uma falência renal aguda provocada por este antitumoral.

Khan et al. (2008) verificaram que após 7 dias da administração intraperitoneal de cisplatina (5mg/Kg p.c.), ratos SHR desenvolviam falência renal aguda, visualizado pela diminuição de 70% do “clearance” de creatinina e aumento em 20% da excreção de sódio, quando comparados a ratos SHR controle negativo.

A redução no peso corpóreo dos animais pode estar relacionada a uma toxicidade gastrointestinal da cisplatina, observada pela diarreia e/ ou menor ingestão de ração. Ammer et al. (1993) observaram em ratos, uma relação entre a diminuição da atividade renal e a perda de peso após a administração de cisplatina, e consideraram que a redução do peso pode ser um índice simples para avaliar o estado citotóxico dos pacientes em uso de cisplatina. A perda de peso tem sido constantemente observada em animais tratados com o fármaco (ANTUNES et al., 2001; FRANCESCATO et al., 2004; SILVA et al., 2001, ALI et al., 2008^a).

A redução do peso corpóreo após o tratamento com o fármaco também pode ser devido aos danos tubulares renais, e subseqüentemente diminuição da reabsorção de água pelas células tubulares, conduzindo à desidratação, aumento do volume urinário e, conseqüentemente à perda de peso (ALI et al., 2008^a). No entanto, no presente estudo não foram observadas alterações no peso corpóreo, avaliados após 24 horas da administração intraperitoneal da cDDP. Este parâmetro também demonstra que as administrações da polpa durante os quatro dias (gavagem) não induziram diarreia ou alteraram a ingestão de ração pelos animais.

Ao avaliar o peso dos rins em relação ao peso corpóreo, pretende-se observar um possível edema do órgão que pode estar relacionado a um processo

inflamatório local. Geralmente é observado em ratos um aumento na relação do peso dos rins/peso corpóreo (SAAD; NAJJAR; ALASHARI, 2004). No entanto, devido ao curto tempo de exposição (24 horas), não se observou diferença estatística nesta relação, nos grupos tratados com o antitumoral.

Um dos mais importantes sistemas antioxidantes intracelular é o ciclo de redução da glutathiona. A glutathiona é um dos componentes essenciais para manter a integridade celular devido à sua propriedade redutora e pela participação no metabolismo celular (ATESSAHIN et al., 2005).

A glutathiona possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da GSH um bom redutor (ATESSAHIN et al., 2005).

Evidências na literatura (MATSUSHIMA et al., 1998; YILDIRIM et al., 2003; SATOH et al., 2003; PABLA e DONG, 2008) indicam que as espécies reativas e as estão envolvidos no estresse oxidativo devido à depleção da concentração de GSH e pelo decréscimo da atividade de enzimas antioxidantes nos rins. Estas observações apóiam a hipótese de que parte do mecanismo de nefrotoxicidade em animais tratados com cisplatina está relacionada com a depleção de antioxidantes endógenos.

O presente trabalho reforça essa hipótese que a cisplatina causa depleção na concentração de GSH no tecido renal, e está de acordo com os resultados de Singh (1989) que realizou experimento em ratos e observou uma diminuição dos níveis de glutathiona renal, 24 horas após a administração de dose única (5mg/Kg p.c.) de

cisplatina. Além disso, a polpa de maracujá amarelo nas duas doses (6 e 8 mg/Kg p.c.), foram eficazes ao atenuarem o decréscimo de GSH tecidual, quando associados ao fármaco.

Ali et al (2008^a) também observaram que a cisplatina depleta as concentrações de glutathiona reduzida e de superóxido dismutase no córtex renal de animais tratados com dose única (6mg/Kg p.c) do fármaco. Ao comparar ratos SHR e Wistar em modelo experimental de diabetes, Biswas et al (2008) observaram que os ratos SHR apresentavam naturalmente menores níveis de GSH e SOD no córtex renal. Ademais, ao analisar parâmetros genotóxicos, os ratos SHR apresentaram maiores danos ao DNA.

Vale ressaltar também que diferentes linhagens de animais e diferença nas idades também podem interferir nos parâmetros renais analisados. Ali et al (2008^b) utilizaram ratos Wistar em 4 fases de desenvolvimento (3, 7, 11 e 24 semanas) e administraram cisplatina dose única (6mg/Kg p.c) e após 6 dias observaram que a nefrotoxicidade induzida pelo fármaco resultou em diminuição do peso corpóreo, *clearance* de creatinina, osmolalidade urinária, menor concentração de glutathiona reduzida e da enzima superóxido dismutase. Além do aumento do peso dos rins, creatinina e uréia. Os autores concluíram que estes parâmetros foram mais evidentes nos ratos de maior idade, e somente a concentração de glutathiona mostrou ser similar em todas as faixas de desenvolvimento. Estes fatos que podem explicar os resultados de GSH deste presente estudo, o qual envolve modelo de ratos SHR (≥ 16 semanas) e análise da nefrotoxicidade após 24 horas da injeção intraperitoneal.

A dosagem de MDA é utilizada como um indicador de peroxidação lipídica tecidual tanto no fígado como nos rins. A maioria dos estudos mostra que a

peroxidação lipídica é relacionada com a nefrotoxicidade da cisplatina (ZHANG e LINDUP, 1993).

A peroxidação lipídica é um mecanismo de morte celular bem estabelecido e utilizado como indicador de estresse oxidativo. Os peróxidos de lipídios são instáveis e se decompõem formando uma complexa série de compostos incluindo compostos carbonil reativos. O MDA e o 4-HNE (4-hidroxi-2(E)-nonenal) são produtos originários da decomposição dos peróxidos de ácidos graxos poliinsaturados da membrana mitocondrial. Esses compostos eletrofílicos são capazes de se difundir através das células causando danos aos componentes celulares e interferindo nas funções basais. Os aldeídos são potentes inibidores enzimáticos, pois podem se ligar aos grupos nucleofílicos dos aminoácidos (como tirosina, cisteína, serina, lisina e histidina), componentes críticos dos sítios ativos enzimáticos ou necessários para a manutenção da estrutura terciária das enzimas (ESTERBAUER et al., 1990). O aumento do MDA, demonstrado no experimento, é apontado como marcador da lipoperoxidação, evento que ocorre após a diminuição das defesas antioxidantes, tais como glutathione reduzida.

Matsushima et al. (1998) interessados em estudar os efeitos dos espécies reativas de oxigênio gerados pela cisplatina na falência renal aguda em ratos, utilizaram a mesma dose do antitumoral (5mg/Kg p.c.) e analisaram os resultados 6 horas após a administração do quimioterápico, os resultados também mostraram aumento nos valores de MDA.

Atasayar et al. (2008) avaliaram o efeito do glicocorticóide aminoguanidina sobre os danos oxidativos induzidos pela dose única (7,5 mg/Kg p.c.) de cDDP. Após três dias da injeção intraperitoneal, observaram aumentos nos níveis de MDA

no plasma, rim e fígado, acompanhados da redução de GSH renal. Além disso, também observaram aumento nos níveis de creatinina sérica e uréia.

No presente estudo, foi possível observar uma elevação nos níveis de MDA tecidual nos animais SHRs tratados com cisplatina. Além disso, dados da literatura comprovam que ratos SHR apresentam níveis de MDA superiores aos ratos Wistar normotensos (ZUHAIR et al., 2000). No entanto, nas associações com a polpa de maracujá amarelo não foi possível visualizar diferença estatística entre os valores. Verifica-se uma tendência que a Polpa II e III foram mais eficientes do que a Polpa I ao atenuarem a peroxidação lipídica.

Não há trabalhos na literatura sobre a atuação dos antioxidantes da polpa de maracujá amarelo na modulação dos danos oxidativos e pressão arterial em modelo animal. Considerando-se a importância dos compostos bioativos, por atuarem como antioxidantes, imunomoduladores e anticarcinogênicos, o presente trabalho também realizou a identificação e quantificação dos compostos majoritários presentes na polpa de maracujá amarelo. A quantificação dos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais da polpa foi de $32,4 \pm 0,12$ (mg de ácido gálico/100g), $14,2 \pm 0,24$ (mg catequina/100g) e $3,17 \pm 0,03$ (mg/100g) respectivamente, além da presença de ácido ascórbico ($6,96 \pm 0,25$ mg/100g). Estes dados estão coerentes com os encontrados por outros trabalhos relatados na literatura (VINCI et al., 1995; MERCADANTE et al., 2002; TALCOTT et al., 2003; KUSKOSKI et al., 2005; ZIBADI et al., 2007; VASCO et al., 2008).

A administração dos extratos das folhas de maracujá tem conseguido, de maneira eficaz, reduzir a hipertensão arterial de ratos SHR. Dentre os inúmeros componentes bioativos encontrados no extrato de maracujá, com potencial antihipertensivo, ressalta-se o flavonóide quercetina e luteolina e o ácido δ -

aminobutírico (GABA) (PEREIRA et al, 2000; DHAWAN et al., 2004, ZIBADI et al., 2007).

Zibadi et al. (2007) utilizaram o extrato da casca do maracujá (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.*) em experimento *in vitro* e *in vivo* (animais e humanos). *In vitro*, o extrato não reduziu as quebras de fitas do DNA, ao se analisar o ensaio do cometa. *In vivo*, a dieta suplementada com 50mg/Kg p.c. do extrato minimizou o aumento da pressão arterial em ratos SHR, acompanhados do aumento dos níveis de óxido nítrico (NO). Após quatros semanas de suplementação com o extrato, via oral, pacientes com hipertensão apresentaram redução significativa da pressão arterial sistólica e diastólica.

Rojas et al. (2006) compararam o efeito do extrato etanólico das folhas de *Passiflora edulis* (2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 mg/kg) e o suco de *Passiflora edulis* liofilizado (2,5; 5,0; 10; 15; 20 mg/kg) na pressão arterial sistólica e diastólica de ratos. Após quatro aferições da pressão, observaram que o extrato e o suco reduziram a pressão dos animais desde o primeiro dia de aferição. Ademais, nenhuma das doses estabelecidas no experimento demonstraram efeitos tóxicos aos ratos. Estes autores atribuíram que a presença do flavonóide quercetina, kaempferol e luteolina poderia agir na modulação da pressão arterial. Podendo também justificar a redução da pressão arterial sistólica dos ratos SHR observada no presente estudo. Visto que, foram encontrados estes mesmos compostos na polpa de maracujá amarelo, na concentração de luteolina 3-glucoside (3,63 mg/100g), quercetina (2,21 mg/100g) e kaempferol (1,78 mg/100g).

Os flavonóides exercem um efeito vasodilatador por modularem a produção de óxido nítrico (NO). O NO produzido pelas células endoteliais desempenha um importante papel no controle cardiovascular, tanto no controle da resistência

periférica vascular como na agregação plaquetária. O NO é um potente vasodilatador e assim seu papel no controle da pressão arterial é extremamente importante (ICHIMURA et al., 2006; ZIBADI et al., 2007).

Embora alguns experimentos *in vivo*, utilizando a casca e/ou as folhas de *Passiflora edulis*, tenham sido realizados a fim de avaliar a atividade biológica do maracujá, ainda não é possível atribuir os efeitos somente a uma única classe de compostos, e sim à provável ação conjunta de diversos compostos bioativos, que podem atuar de forma sinérgica em sistemas biológicos. Assim, a utilização da polpa poderia conferir maior valor agregado ao fruto tropical, por possuir estes mesmos compostos bioativos presentes na casca e nas folhas.

A cDDP é capaz de gerar EROs como o radical superóxido e o radical hidroxila. A indução do estresse oxidativo pela geração de EROs provoca um desbalanço pró-oxidante e antioxidante na célula podendo lesar o DNA e outras macromoléculas e estruturas celulares (KOSMIDER e OSIECK, 2004; CEMELI et al., 2008).

O estresse oxidativo pode induzir potenciais danos genotóxicos ao DNA pela ação direta das espécies reativas de oxigênio no DNA ou indiretamente via produtos de degradação da peroxidação lipídica. Existem vários mecanismos antioxidantes intracelulares de proteção ao DNA, incluindo seqüestradores de espécies reativas de oxigênio ou inativação enzimática de espécies reativas de oxigênio. Ativação e transcrição de enzimas antioxidantes e de reparo do DNA também possuem papel fundamental na manutenção de baixos níveis de danos ao DNA em condições intracelulares normais, em resposta à variações do estado de oxidação da célula (SZETO; COLLINS; BENZIE, 2002; CEMELI et al. 2008).

O teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes utilizados para se avaliar novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado. Esses testes são capazes de detectar agentes químicos e físicos indutores de mutação e, por isso, tóxicos para o gene (genotóxicos), já que altera a seqüência do DNA, o que leva a uma alteração herdável da função gênica. O conhecimento do potencial genotóxico das substâncias utilizadas pelo ser humano é essencial, pois mutações são freqüentemente associadas com o desenvolvimento de câncer e defeitos congênitos. Portanto, não se pode deixar de avaliar os riscos para o ser humano quando se trata de agentes químicos ou físicos ainda não estudados (RIBEIRO et al., 2003).

A toxicidade celular, em medula óssea, é normalmente indicada pela diminuição da proporção PCEs/NCEs. De acordo com Gollapudi e Mcfadden, (1995), o número de PCEs nos grupos tratados (controle positivo) não deve ser inferior a 20% do controle negativo. No presente estudo, a relação PCEs/NCEs apresentou-se reduzida nos animais SHR, quando comparados com os animais WKY. Acredita-se que essa tendência esteja relacionada às características genéticas da linhagem desses animais, ou que seja causada pela hipertensão que eles desenvolvem naturalmente.

Segundo o procedimento original (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1976), os micronúcleos (MNs) são contados nos eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expelem seu núcleo, ao se transformarem em eritrócitos, os MNs permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis. Os eritrócitos jovens são policromáticos (ácido ribonucléico -RNA - positivos), isto é, coram-se em azul e não em salmão/laranja. Se os MNs forem contados apenas nesse tipo de célula, haverá

a segurança de que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. Como o período entre a última divisão e a formação do eritrócito policromático (PCE) é de 8 a 12 horas, só serão encontrados MNs induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo no qual os MNs podem ser detectados corresponde à duração do estágio do PCE, entre 10 a 24 horas.

O antineoplásico administrado intraperitonealmente como controle positivo na concentração 5mg/Kg, acarretou um aumento significativo no número médio de células com micronúcleo. Observou-se ainda que a frequência média de MNs foi maior nos ratos SHR em relação aos ratos Wistar em ambos os controles positivo e negativo. Estes dados podem ser confirmados com o estudo de Almeida et al. (2008), que analisaram a indução de aberrações cromossômicas em ratos SHR e Wistar após o tratamento com amiodarona, e observaram que a frequência basal de aberrações cromossômicas e metáfases anormais eram maiores nos ratos SHR do que nos Wistar (controles negativos). E ao analisar a frequência de danos cromossômicos nos controles positivos (ciclofosfamida), também se observou que os ratos SHR foram mais sensíveis aos danos do que os ratos Wistar.

O Teste do Micronúcleo aplicado neste trabalho não revelou aumento no número médio de eritrócitos policromáticos com micronúcleo, nas três doses da polpa (SHR Polpa I, II e III), quando comparado com os controles negativos SHR e Wistar. Esses resultados indicam que a polpa não apresentou efeito clastogênico e/ou aneugênico quando administrado oralmente aos ratos.

Nas condições experimentais deste estudo, os resultados obtidos no teste de micronúcleo mostraram uma tendência antimutagênica por parte da polpa de

maracujá, pois houve uma redução de células micronucleadas nos animais tratados com o fármaco, quando comparados ao grupo controle SHR negativo.

Nersesyan e Muradyan (2004) estudaram a capacidade antimutagênica do suco de “Sea-Buckthorn” sobre os danos induzidos pela cDDP (1,2 e 2,4 mg/Kg p.c.) em camundongos. Durante 5 ou 10 dias, os animais receberam 0,3 ml do suco (gavagem) e após 24 horas da injeção intraperitoneal, realizou-se o Teste do Micronúcleo em medula óssea. Os autores observaram que o suco diminuiu o efeito mutagênico da cDDP somente na menor dose do fármaco (1,2 mg/Kg p.c.). Sendo que o suco não apresentou efeito citotóxico ao analisar-se a razão entre os eritrócitos policromáticos e normocromáticos em 500 células.

Embora tenha sido observada uma tendência protetora da polpa de maracujá amarelo, nas três doses testadas, inibindo a formação de MNs pela cDDP, esse efeito não foi observado pelos parâmetros determinados no Ensaio do Cometa. Neste ensaio, os grupos tratados com a polpa e cDDP resultaram em nucleóides com caudas menores do que as observadas no controle negativo, fato observado principalmente nas células hepáticas. No entanto, nota-se nos grupos tratados com a polpa de maracujá, uma redução da extensão dos nucleóides quando comparados ao grupo SHR controle negativo.

A aplicação do Ensaio do Cometa em células renais e hepáticas permitiu a coleta de informações de danos ao material genético de diferentes tecidos submetidos às diferentes doses da polpa e do antitumoral. Permitindo assim, a avaliação da heterogeneidade destes danos em diferentes células.

Em geral, no Ensaio do Cometa a determinação dos danos ao DNA é atribuída a um aumento na migração na cauda dos nucleóides, entretanto, estudos têm sugerido que a migração do DNA nos nucleóides é retardada por ligações

cruzadas ao DNA intercadeia e facilitadas pelas ligações intracadeia (PANG et al., 2007). A existência de ligações cruzadas ao DNA intercadeia leva a uma tendência de diminuir a mobilidade eletroforética do DNA resultando em uma diminuição da cauda dos nucleóides, o que pode ser observado com uma redução em parâmetros como “*Tail moment*” e o “*Olive moment*”, fatos que também foram observados na análise visual (ALMEIDA et al., 2006).

Esta menor migração do DNA nos nucleóides, também foi verificada por Nessler et al. (2007), que aplicaram o Ensaio do Cometa em células renais de ratos; para o ensaio foram padronizadas duas doses de cisplatina (5mg/Kg e 10 mg/Kg), os resultados demonstraram diminuição da média do “*Olive Tail Moment*” em ambos os grupos tratados com o fármaco. Sasaki et al. (2000) também não observaram migração do DNA em células renais quando a cDDP foi administrada oralmente à camundongos. Nota-se que estas observações já foram relatadas na literatura em experimentos *in vitro* ao analisar linfócitos humanos (PFUHER et al., 1996) e cultura de células V79 (provenientes de fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês), tratadas com a cisplatina (MERK et al., 1999).

Nessler et al. (2007) demonstraram que as ligações cruzadas não são detectados pelo Ensaio do Cometa nas condições padrões de eletroforese (0,7 V/cm – 25V/300mA) por 20 minutos. E ao modificarem as condições experimentais, com o aumento da duração da eletroforese para 40 minutos, observaram que poderia ser uma alternativa para o estudo de agentes alquilantes que causam ligações cruzadas.

A versão alcalina do Ensaio do Cometa é capaz de detectar quebras em uma ou duas fitas do DNA, assim como sítios álcali-lábeis, bem como ligações anômalas entre DNA-DNA e DNA-proteínas. A vantagem deste ensaio é a sua sensibilidade

em detectar baixos níveis de danos ao DNA (TICE et al., 2000). Por outro lado, os micronúcleos são normalmente formados por fragmentos cromossômicos devido a quebras na dupla fita de DNA, e que ficam excluídos do núcleo das células filhas durante a divisão celular (SALAMONE et al., 1980). Esse tipo de dano cromossômico também pode ser detectado pelo Ensaio do Cometa. Entretanto, os MNs ainda podem ser formados se cromossomos inteiros ficarem excluídos do núcleo (efeitos aneugênicos), e esse tipo de mutação dificilmente é detectado pelo ensaio do cometa. Esses detalhes entre as duas metodologias utilizadas no trabalho nos permitem hipotetizar que a cisplatina possa ter apresentado um efeito aneugênico nas células precursoras dos eritrócitos policromáticos analisados, o que explicaria em parte, o aumento de MNs observado no Teste do Micronúcleo e a não observação de genotoxicidade no ensaio do cometa.

Embora, o Ensaio do Cometa possa ser considerado mais sensível na avaliação de danos ao DNA por agentes genotóxicos que o Teste do Micronúcleo, deve-se levar em consideração os diferentes mecanismos envolvidos quando resultados positivos são observados. Essencialmente, o Teste do Micronúcleo detecta lesões que sobreviveram pelo menos um ciclo celular, e o Ensaio do Cometa lesões ao DNA reparáveis ou sítios álcali-labeis (GOETHEM; LISON; KIRSCH-VOLDERS, 1997).

Dependendo do estágio do ciclo celular, da capacidade de reparo, das características genéticas gerais da célula e do agente analisado, apenas uma fração dos danos induzidos ao DNA vão se transformar em mutações. Assim, é interessante investigar a correlação entre a extensão das quebras de DNA quantificadas no Ensaio do Cometa e a frequência de MNs nas mesmas condições experimentais, possibilitando a estimativa da quantidade de quebras de DNA

convertidas em mutações cromossômicas, contribuindo para a compreensão da genotoxicidade dos agentes testados (GOETHEM; LISON; KIRSCH-VOLDERS, 1997).

De acordo com o protocolo descrito por Tice et al. (2000), o decréscimo na viabilidade celular para a realização do Ensaio do Cometa não deveria ser inferior a 30%, e os períodos sugeridos para a preparação das amostras seriam entre 3 e 6 h nos tratamentos de curta duração e entre 22 e 26 h para os tratamentos crônicos. No presente estudo, o tratamento não demonstrou alterações na integridade das membranas celulares, e a porcentagem de células viáveis (hepáticas e renais) foram superiores a 70%.

Franke et al. (2005) interessados em avaliar o efeito de agentes alquilantes (ciclofosfamida – 25 mg/Kg p.c, e metil metanosulfonato – 40 mg/Kg p.c) sobre os danos induzidos ao DNA, administraram oralmente à camundongos suco de laranja (0,1 ml/10 g p.c.). O teste do cometa aplicado em células de sangue periférico demonstrou que o suco foi capaz de reduzir a extensão dos danos causados por ambos os agentes genotóxicos. Para cada animal foram analisadas 100 nucleóides, utilizando-se o escore visual. O efeito antígeno-tóxico do suco, em parte, foi atribuído a capacidade de seus compostos biativos atuarem na modulação de enzimas da fase I e II; atuarem como seqüestradores de espécies reativas e participarem do mecanismo de reparo do DNA (BUB et al., 2003).

Brozovic et al. (2008) avaliaram o efeito genotóxico da combinação de uma droga antineoplásica (cisplatina) e um anestésico (sevoflurano) em leucócitos, fígado, rim e cérebro de camundongos. Os animais foram expostos durante três dias consecutivos a 2,4 vol% do anestésico durante duas horas, seguido de injeção i.p. de cDDP (5mg/Kg p.c.). Os resultados demonstraram que a combinação das drogas

induziu maiores efeitos genotóxicos quando avaliados o “*tail length*” em todos os tipos celulares estudados. No entanto, os grupos tratados somente com a cDDP a migração da cauda dos nucleóides foram menores do que o controle negativo, conforme observado na presente investigação.

Para a avaliação antigenotóxica/genotóxica dos extratos de espécies de *Miconia* contra os danos induzidos pelo antitumoral ciclofosfamida Serpeloni et al. (2008) aplicaram o Teste do Micronúcleo e o Ensaio do Cometa em células de sangue periférico de camundongos *Swiss*. Todos os extratos de *Miconia* administrados oralmente (0,1 mL/10 p.c) apresentaram baixos níveis de danos genotóxicos, com predominância de nucleóides de classe 1, sendo que nenhum efeito mutagênico foi observado pelo Teste do Micronúcleo. O estudo demonstrou que o uso de extratos pode ser mais vantajoso do que o uso de compostos isolados, visto que a interação entre taninos, ácidos fenólicos e flavonóides poderiam potencializar o efeito antimutagêncio dos extratos.

Recentemente, o consumo de sucos de frutas tem sido objeto de estudo de alguns trabalhos na área de toxicogenética, com o intuito de avaliar o potencial antimutagênico frente a agentes indutores de danos ao DNA (BUB et al., 2003; CEMELI, et al., 2008; HOELZL et al., 2008). Weisel et al. (2006) investigaram os efeitos do consumo de 700 ml/dia de suco de frutas vermelhas (rico em antocianinas) em indivíduos saudáveis. Os resultados demonstraram efeito protetor quanto aos danos ao DNA, visualizado no Ensaio do Cometa e aumento dos níveis de glutathione. No entanto, nenhum efeito foi observado nos níveis de malondialdeído plasmático.

Wilms et al. (2007) avaliaram em 168 indivíduos o efeito do consumo de suco de maçã + “blueberry”, composto por 97 mg de quercetina e 16 mg de ácido

ascórbico. Após quatro semanas, realizou-se o Ensaio do Cometa em linfócitos. Os resultados mostraram redução de 20% dos danos induzidos ao DNA. Já os resultados do trabalho de Riso et al. (2006), demonstraram que o consumo de suco de tomate (250mL/dia – contendo 5,7 mg de licopeno, 3,7 mg de fitoeno, 2,7 mg de fitoflueno, 1 mg de β -caroteno, e 1,8 mg de α -tocoferol) durante 26 dias, não alterou os parâmetros de peroxidação lipídica e danos ao DNA (DNA% *in tail*).

A ingestão de frutas ricas em vitamina C parece aumentar as defesas antioxidantes do organismo. No entanto, não está claro se este papel seria atribuído somente à vitamina C. Assim Guarnieiri et al. (2007) estudaram o consumo de suco de laranja (300 mL/dia, contendo 150 mg de vitamina C) ou vitamina C (composto isolado) em indivíduos saudáveis. Após duas semanas da ingestão do suco/vitamina, amostras de sangue foram coletadas e realizou-se o Ensaio do Cometa. Os resultados mostraram que o suco de laranja promoveu maior proteção nos linfócitos humanos quando comparados ao grupo controle H_2O_2 , enquanto que a dieta somente com a vitamina C não mostrou os mesmos níveis de proteção. Assim, o efeito protetor do suco não seria atribuído somente à presença de vitamina C, mas pelos outros fitoquímicos presentes no alimento.

Dessa forma, os resultados do presente estudo indicam que a polpa de maracujá amarelo pode ser considerada um alimento capaz de prevenir danos mutagênicos induzidos pela cisplatina *in vivo* e também poderia ajudar na modulação do estresse oxidativo encontrado na quimioterapia com este fármaco. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para melhor entender os mecanismos envolvidos na atividade protetora deste fruto.

6- CONCLUSÃO

Tendo em vista os objetivos e hipóteses propostas e com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

1. O tratamento com doses múltiplas da polpa de maracujá amarelo não alterou os parâmetros da função renal analisados, entretanto, as maiores doses (Polpa II e III) apresentaram tendência no aumento dos níveis renais de GSH nos ratos SHR;

2. O tratamento com a cisplatina promoveu um aumento dos níveis das SRATB (MDA), bem como decréscimo nos níveis de GSH nos rins dos animais, reforçando a hipótese que a peroxidação lipídica está relacionada com o mecanismo de nefrotoxicidade;

3. Uma das hipóteses para a redução da pressão arterial sistólica observada neste trabalho, pode ser atribuída à presença de alguns compostos (quercetina, luteolina, kaempferol, ácido cafeico) e outros ainda não identificados na polpa de maracujá amarelo;

4. A interação entre os fitoquímicos presentes na polpa de maracujá demonstraram eficácia na redução da mutagenicidade e efeitos protetores antioxidantes.

5. Embora no Ensaio do Cometa tenha sido observado um efeito protetor da polpa contra danos genotóxicos induzidos pela cDDP, este efeito não pode ser confirmado neste ensaio, pois a cisplatina não é um bom indutor de danos recomendado para este método, devido à produção de ligações cruzadas que interferem na migração do DNA.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* De acordo com a Norma Técnica da ABNT NBR 6023 – Informação e Documentação – Referências – Elaboração (ago./2000). Abreviatura de periódicos segundo Norma Técnica da ABNT NBR 6032 – Abreviação de Título de Periódicos e Publicações.

ALI, B.H.; MOUNDHRI, M.S.AL. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: A review of some recent research. **Food Chem. Toxicol.**, v.44, n.8, p.1173-83, 2006.

ALI, B.H.; MOUNDHRI, M.S.AL.; ELDIN, T.M.; NEMMAR, A., AL-SIYABI, S.; ANNAMALAI, K. Amelioration of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats by Tetramethylpyrazine, a Major Constituent of the Chinese Herb Ligusticum wallichii. **Exp. Biol. Med.**, v. 233, n.7, p. 891-896, 2008^a.

ALI, B.H.; MOUNDHRI, M.S.AL.; TAGELDIN, M.; AL HUSSEINI, I.S.; NEMMAR, A., TANIRA., M.O. Ontogenetic aspects of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Food Chem. Toxicol.** (2008^b), doi: 10.1016/j.fct.2008.07.030

ALMEIDA, G.M.; DUARTE, T.L.; STEWARD, W.P.; JONES, G.D. Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro and in cancer patients using the alkaline comet assay. **DNA repair.**, v. 5, n. 2, p. 219-225, 2006.

ALMEIDA, M.R.; LIMA, E.O.; SILVA, V.J.D.; CAMPOS, M.G.; ANTUNES, L.M.G.; SALMAN, A.K.D.; DIAS, F.L. Genotoxic studies in hypertensive and normotensive rats treated with amiodarone. **Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.** (2008), doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.005.

AMARAL, C.L.; FRANCESCATO, H.D.; COIMBRA, T.M.; COSTA, R.S.; DARIN, J.D.; ANTUNES, L.M.; BIANCHI, M.L.P. Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Arch. Toxicol.**, v.82; n.6, p. 363-370, 2008.

AMMER, U; NATOCHIN, Y; DAVID, C; RUMRICH, G; ULLRICH, K. J. Cisplatin nephrotoxicity: site of functional disturbance and correlation to loss of body weight. **Ren. Physiol. Biochem.**, v. 16, n.3, p. 131-145, 1993.

ANTUNES, L.M.G.; DARIN, J.D.C.; BIANCHI, M.L.P. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 43, p. 145-150, 2001.

ANTUNES, L.M.G.; DARIN, J.D.C.; BIANCHI, M.L.P. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats, a dose dependent study. **Pharmacol. Res.**, v. 41, n.4, p. 405-411, 2000.

ANTUNES, L.M.G.; PASCOAL, L.M.; DIAS, F.L.; BIANCHI, M.L.P. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 585, n. 1-2, p. 113-119, 2005.

ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food Chem. Toxicol.** [Review], v.32. n.7, p.671-683, 1994.

- ATASAYAR, S.; GÜRER-ORHAN, H.; ORHAN, H.; GÜREL, B.; GIRGIN, G.; ÖZGÜNES, H. Preventive effect of aminoguanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Exp. Toxicol. Pathol.** (2008), doi:10.1016/j.etp.2008.04.016.
- ATESSAHIN, A.; YILMAZ, S.; KARAHAN, I.; CERIBASI, A. O.; KARAOGLU, A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. **Toxicology.**, v. 212, v.2-3, p. 116-123, 2005.
- BAEK, S. M.; KWON, C. H.; KIM, J. H.; WOO, J. S.; JUNG, J. S.; KIM, Y. K. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 142, n.3, p. 178-186, 2003.
- BALDEW, G.S.; VAN DEN HAMER, C.J.A.; LOS, G.; VERMEULEN, N.P.E.; GOEIJ, J.J.M.; McVIE, J.G. The mechanism of interaction between cisplatin and selenite. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, n. 10, p. 1429-1437, 1991.
- BISWAS, S.K.; PEIXOTO, E.B.; SOUZA, D.S.; FARIA, J.B.L. Hypertension increases pro-oxidant generation and decreases antioxidant defense in the kidney in early diabetes. **Am J Nephrol.** (2008). doi: 10.1159/000109993
- BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities on protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, n.1-2, p. 248-256, 1976.
- BROZOVIC, C.; ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, F.; KNEZEVIC, A.H.; BENKOVI, V.; VRDOLJAK, D.V.; SARIC, A. Evaluation of DNA damage in vivo induced by combined application of cisplatin and sevoflurane. **Eur. J. Anaesthesiol.**, v.25, n.8, p.642-647, 2008.
- BUB, A.; WATZL, B.; BLOCKHAUS, M.; BRIVIBA, K.; LIEGIBEL, U.; MULLER, H.; POOL-ZOBEL, B.L. RECHKEMMER, G. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. **J.Nutr. Biochem.**, v 14, n.2, p. 90-98, 2003.
- BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutat. Res.** v. 627, n.1, p. 31-35, 2007.
- CAMARGO, S.M.R.; FRANCESCATO, H.D.C.; LAVRADOR, M.A.S.; BIANCHI, M.L.P. Oral administration of sodium selenite minimizes cisplatin toxicity on proximal tubules of rats. **Biol. Trace. Elem. Res.**, v. 83, n.3, p.251-62. 2001.
- CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON D. Antioxidants and the Comet assay, **Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.** (2008), doi:10.1016/j.mrrev.2008.05.002
- CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v.344; n. 892624, p. 862-863, 1994.
- ÇETIN, R.; DEVRINM, E; KILICOGLU, B.; AVCI, A.; CANDIR, O.; DURAK, I. Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods. **J. Appl. Toxicol.**, v. 26, n.1, p. 42-46, 2006.
- CHAN, S.H.H.; TAI, M.H.; LI, C.Y.; CHAN, J.Y.H. Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutase and catalase contributes to oxidative stress and

neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, n.11, p. 2028-39, 2006.

CLIFTON, G. G.; PEARCE, C.; O'NEILL, W. M. Jr; WALLIN, J. D. Early polyuria in the rat following single-dose cis-dichlorodiammineplatinum (II): effects on plasma vasopressin concentration and posterior pituitary function. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 100, n.5, p. 659-670, 1982.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). **Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório**. National Research Council. Editora UFG, 2003, Goiás-GO, 162 p. Edição em português.

CONKLIN, K.A. Cancer chemotherapy and antioxidants, **J. Nutr.**, v. 134, p. 3201S-3104S, 2004.

DA SILVA, J.; FREITAS, T.R.O.; MARINHO, J.R.; SPEIT, G.; ERDTMANN, B. An alkali single-cell gel eletroforesis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genet. Mol. Biol.**, v 23, p. 241—245, 2000.

DAUGAARD, G. Cisplatin nephrotoxicity: experimental and clinical studies. **Dan. Med. Bull.**, v.37, n.1, p. 1-12, 1990.

De ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **J. Agric. Food Chem.** v.55, p.5062-5072, 2007.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 1-23, 2004.

ELSEENDOORN, T.J.; WEIJL, N.I.; MITHOE, S.; ZWINDERMAN, A.H.; VAN DAM, F.; DE ZWARF, F.A.; TATES, A.D.; OSANTO, S. Chemotherapy-induced chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients supplemented with antioxidants or placebo. **Mutat. Res.**, v.498, n.1-2, p.145-158, 2001.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzimol.**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FATIMA, S.; YUSUFI, A. N. K.; MAHMOOD, R. Effect of cisplatin on renal brush border membrane enzymes and phosphate transport. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 23, n.12, p. 547-554, 2004.

FENECH, M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics – diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. **Food Chem. Toxicol.** v.46, n.4, p. 1365–1370, 2008.

FENECH, M., FERGUSON, L. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. **Mutat. Res.** v. 475, n.1-2, p. 1-6, 2001.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human Micronucleus project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res.**, v.428, n.1-2, p.271-283, 1999.

FERGUSON, L. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutat Res.**, v. 475, n.1-2, p. 89-111, 2001.

FERREIRA C.; CESARETTI M.; GINOZA M.; ZANELLA M.; RIBEIRO A.; KOHLMANN O. Insulin sensitizers drugs administration to a rat model of the metabolic syndrome: Effects upon glucose metabolism and blood pressure. **J. Hypertens.**, 23(suppl 2), p.238-240, 2005.

FRANCESCATO, H.D.; COIMBRA, T.M.; COSTA, R.S.; BIANCHI, M.L.P. Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. **Kid. Blood Press Res.**, v. 27, n.3, p. 148-158, 2004.

FRANKE, S.I.R.; PRÁ, D.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. Influence of Orange juice over the genotoxicity induce by alkylating agents: an *in vivo* analysis. **Mutagenesis.**, v.20, n.4, p.279-283, 2005.

GIACCONE, G. Clinical perspectives on platinum resistance. **Drugs**, v. 59, Suppl. 4, p. 9-17, 2000.

GOETHEM, V.F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutat. Res.**, v. 392, n.1-2, p. 31-43, 1997.

GOLLAPUDI, B.B.; MCFADDEN, L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutat. Res.**, v.347, n.2, p. 97-99, 1995.

GONTIJO, Á. M.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de danos no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 247-271.

GONZALES-VITALE, J.C.; HAYES, D.M.; CVITKOVIC, E.; STERNBERG, S.S.. **Cancer Chemother. Rep.**, v.39, n.4, p. 1362-1371, 1977.

GORDON, J. A.; PETERSON, L. N.; ANDERSON, R. J. Water metabolism after cisplatin in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 243, n. 1, F36-43, 1982.

GOULDSBOROUGH, I.; LINDOP, G.B.M.; ASHTON, N. Renal rennin-angiotensin system activity in naturally reared and cross-fostered spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, v.16, n.10, p.864-869, 2003.

GUMINSKI, A.D.; HARNETT, P.R.; DEFAZIO, A. Scientists and clinicians test their metal-back to the future with platinum compounds. **Lancet Oncol.**, v.3, n.5, p.312-318, 2002

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr. Rev.**, v.52, n.8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, v.33, n.7, p. 601-617, 1995 [Review].

HANIGAN, M.H.; DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Ther.**, v.1, p.47- 61, 2003.

HARTMANN, J.T.; LIPP, H.P. Toxicity of platinum compounds. **Expert Opin. Pharmacother.**, v.4, n.6, p.889-901, 2003.

HARTREE, E. Determination of protein: a modification of long method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem.**, v.48, p. 422-7, 1972.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. **Mutat. Res.**, v. 18, n.2, p. 187-190, 1973.

HOELZL, C.; KNASMÜLLER, S.; MISIK, M.; COLLINS, A.; DUSINSKA, M.; NERSESYAN, A. Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: Recent results and trends. **Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.** (2008), doi:10.1016/j.mrrev.2008.07.004

HURSTING, S.D.; NUNEZ, N.P.; PATEL, A.C.; PERKINS, S.N.; LUBET, R.A.; BARRETT, J.C. The utility of genetically altered mouse models for nutrition and cancer chemoprevention research. **Mutat. Res.**, v.576, n.1-2, p.80-92, 2005.

ICHIMURA, T.; UAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect on na extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.3, p. 718-721, 2006.

JACOBS, C.; KALMAN, S.M.; TRETTON, M.; WEINER, M.W. Renal handling of *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Treat. Rep.**, v. 64, n.12, p. 1223-1226, 1980.

KAYANE, M.A.; PARRY, J.M. The detection and assessment of the aneugenic potential of selected oestrogens, progestins and androgens using the *in vitro* cytokinesis blocked micronucleus assay. **Mutat. Res.**, v.651, n.1-2, p.40-45, 2008.

KHAN, M.A. H; SATTAR, M.A.; ABDULLAH, N.A; JOHNS, E.J. Cisplatin-induced nephrotoxicity causes altered renal hemodynamics in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats: Role of augmented renal alpha-adrenergic responsiveness. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 59, n.3-4, p. 253-260, 2007.

KHAN, M.A. H.; SATTAR, M.A.; ABDULLAH, N.A.; JOHNS, E.J. Influence of combined hypertension and renal failure on functional α 1-adrenoceptor subtypes in the rat kidney. **British J. Pharmacol.**, v.153, p.1232-1241, 2008.

KNASMÜLLER, S.; STEINKELLNER, H.; MAJER, B.J.; NOBIS, E.C.; SCHARF, G.; KASSIE, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: Methodological aspects and extrapolation problems. **Food Chem. Toxicol.**, v.40, n.8, p.1051-1062, 2002.

KOSMIDER, B.; OSIECK, R. Flavonoids Compounds: A review of anticancer properties and interactions with *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Drug Dev. Res.**, v.63, p. 200-211, 2004.

KUSKOSKI, E.M.; ASVERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J. FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidant em pulpa de frutos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, n.4, p. 726-732, 2005.

LASSÈGUE, B; GRIENDLING, K.K. Reactive oxygen species in hypertension [Review]. **Am. J. Hypertension.** v.17, p. 852-860, 2004.

- LERMAN, L.O.; CHADE, A.R.; SICA, V.; NAPOLI, C. Animal models of hypertension: An overview. **J. Lab. Clin. Med.**, v.146, n. 3, p. 160-173, 2005.
- LIPPARD, S.J. Chemistry and molecular biology of cisplatin anticancer drugs. **Pure Appl. Chem.**, v. 59, p.731-42, 1987.
- LITTERST, C.L.; SMITH, J.H.; SMITH, M.A.; UOZUMI, J.; COPLEY, M. Sensitivity of urinary enzymes as indicators of renal toxicity of the anticancer drug *cis*-platin. **Uremia Invest.**, v. 9, n.2, p. 111-117, 1985.
- MATSUSHIMA, H.; YONEMURA, K.; OHISHI, K.; HISHIDA, A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 131, n.6, p. 518-526, 1998.
- MERCADANTE, A.Z.; SILVA, S.R. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa) in natura. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, v.3, n.22, p. 254-258, 2002.
- MERK, O.; SPEIT, G. Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 33, n.2, p.167-172, 1999.
- MISHIMA, K.; BABA, A.; MATSUO, M.; ITOH, Y.; OISHI, R. Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity. **Free Radic. Bio. Med.** v.40, n.9, p. 1564-1577, 2006.
- MORA, L.O.; ANTUNES, L.M.; FRANCESCATO, H.D.; BIANCHI, M.L.P. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 47, n.6, p. 517-522, 2003.
- NERSESYAN, A.; MURADYAN, R. Sea-buckthorn juice protects mice against genotoxic action of cisplatin. **Exp. Oncol.**, v.26, n. 2, p. 153-155, 2004.
- NESSLANY, F.; ZENNOUCH, N.; SIMAR-MEINTIERES, S.; TALAHARI, I.; NKUI-MBOUI, E.N.; MARZIN, D. In vivo comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutat. Res.**, v.630, n.1-2, p.28-41, 2007.
- NISHIKAWA, M.; NAGATOMI, H.; CHANG, B.; SATO, E.; INOUE, M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits mitochondrial injury and renal dysfunction induced by cisplatin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 387, n. 1, p. 78-84, 2001.
- NORDBERG, J.; ARNÉ, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiol system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.**, v.27, n.6, p.282-293, 1963.
- PABLA N; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney Int.**, v.73, n.9, p. 994-1007, 2008.
- PANG, S.K.; YU, C.W.; AU-YEUNG, S.C.; HO, Y.P. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 363, n. 1, p. 235-240, 2007.

- PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.
- PETRY, R.D.; REGINATTO, F.; DE PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J. et al. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytother. Res.**, v. 15, n.2, p. 162-164, 2001.
- PFUHLER, S.; WOLF, H. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, **Environ. Mol. Mutagen.**, v.27, n.3, p.196–201, 1996.
- PHILLIPS, I. M. Gene Therapy for Hypertension: The Preclinical Data. **Hypertension.**, n.38, n.2-3, p.543-548, 2001.
- PIETTA, P.G.J. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v.63, p. 1035-1042, 2000.
- POIRSON-BICHAT, F.; GONÇALVES, R.A.B.; MICCOLI, L.; DUTRILLAUX, B.; POUPON, M.F. Methionine depletion enhances the antitumoral efficacy of cytotoxic agents in drug-resistant human tumor xenografts. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, n.2, p. 643-53, 2000.
- RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese – Métodos e critérios de avaliação**. Sociedade Brasileira de Genética, p. 83-85, 1991.
- RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: **Mutagênese Ambiental**. Editora ULBRA, p 173-200, 2003.
- RISO, P.; VISIOLI, F.; GRANDE, G.; GUARNIERI, S.; GARDANA, C.; SIMONETTI, P.; PORRINI, M. Effect of a tomato-based drink on markers of inflammation, immunomodulation, and oxidative stress, **J. Agric. Food Chem.** v. 54, n.7, p. 2563–2566, 2006.
- ROJAS, J.; RONCEROS, S.; PALOMINO, R.; TOMÁS, G.; CHENGUAYEN. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá), em ratas. **An. Fac. Med. Lima**, v.67, n. 3, p. 206-213, 2006.
- ROSEMBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. **Cancer.**, v. 55, p.2303-16, 1985.
- SAAD, S. Y.; NAJJAR, T. A.; ALASHARI, M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 31, n.12, p. 862-867, 2004.
- SADZUKA, Y.; SHOJI, T.; TAKINO, Y. Mechanism of the increase in lipid peroxide induced by cisplatin in the kidneys of rats. **Toxicol. Lett.**, v. 62, p. 293-300, 1992.
- SAFIRSTEIN, R.; MILLER, P.; DIKMAN, S.; LYMAN, N. SHAPIRO, C. Cisplatin nephrotoxicity in rats: defect in papillary hypertonicity. **Am. J. Physiol.**, v. 241, n.1-2, p. F175-F185, 1981.
- SALAMONE, M. Towards improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. **Mutat. Res.**, v. 74, n. 5, p. 347-356, 1980.

SALZANO, F.M. Saúde pública no primeiro e terceiro mundos: desafios e perspectivas. **Ciências e Saúde coletiva.**, v.7, n.1, p. 7-16, out. 2002.

SASAKI, Y.F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The Comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.30, n.6, p.629–799, 2000.

SATOH, M.; KASHIHARA, N.; FUJIMOTO, S.; HORIKE, H.; TOKURA, T.; NAMIKOSHI, T.; SASAKI, T.; MAKINO, H. A novel free radical scavenger, edarabone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 305, n.3, p. 1183-1190, 2003.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: HOLLAENDER, A. (Ed.). **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1976. v.4, p. 31-53.

SEDLAK, M.; LINDSAY, R. Estimation of total, protein-bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v.25, n.1-2, p. 192-205, 1968.

SERPELONI, J.M.; REIS, M.B.; RODRIGUES, J.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; DOKKEDAL, A.L.; CÔLUS, I.M.S. *In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from Miconia species using the comet assay and micronucleus test. **Mutagenesis.**, v.23, n.6, p.501–507, 2008.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. **Braz. J. Food Technol.**, v. 2, p.7-19, 1999.

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

SINGH, G. A possible cellular mechanism of capsulation induced nephrotoxicity. **Toxicol.**, v.58, p. 71-80, 1989.

SINGH, M.; KAUR, P.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. **Mutat. Res.**, v.654, n.2, p.145-149, 2008.

SINGH, N.P. KAUR, P.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. **Mutat. Res.**, v. 252, n. 3, p. 289-296, jun. 1991.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amerc. J. Enol. Viti.** v.16, n.-2, p.144-158, 1965.

SOUZA, C.A.; VIGORITO, A.C.; ARANHA, F.J.P.; OLIVEIRRA, G.B.; EID, K.A.B.; RUIZ, M.A. Terapêutica citoprotetora em paciente tratados com quimio e/ou radioterapia antineoplásica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.22, n.2, p. 123-8, 2000.

- SOUZA, M. C. C.; BENASSI, M. T.; MENEGHEL, R. F. A.; SILVA, R. S. S. F. Stability of unpasteurized and refrigerated orange juice. **Braz. Arch. Bio. Tech.** v.47, n.3, p.391-397, 2004.
- SZETO, Y.T.; COLLINS, A.R.; BENZIE, I.F. Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. **Mutat. Res.** , v. 500, n. 1-2, p. 31-38, 2002.
- TAKAHASHI, C.S. Testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidia. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. 356p.
- TALCOTT, S.T., PERCIVAL, S.S., PITTET-MOORE, J., CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidants stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **J. Agric. Food Chem**, v. 51, n.4, p. 935-941, 2003.
- THIEL, G.; BRUNNER, F.; WUNDERLICH, P.; HUGENIN, M.; BIENKO, B.; TOR HORHORST, J.; PETERS-HAEFELI, L.; KIRCHERTZ, E.Z.; PETERS, G. Protection of rat kidneys against Hg C12- induced acute renal failure by induction of high urine flow without renin suppression. **Kidney Int.**, v. 10, p. 191-198, 1976.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.35, n.3, p.206-221, 2000.
- TITENKO-HOLLAND. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. **Mutat. Res.** v.15, n.1, p.85-95, 1997.
- TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L.. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem. Cell. Biol.**, v.4, n.122, p.339-352, 2004.
- TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D.. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circ Res.** v.48, n.3, p.309-319, 1981.
- UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem.**, v.86, n.1-2, p.271-278, 1978.
- VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chem.**, v.111, p.816-823, 2008.
- VASDEV S.; LONGERICH L.; GILL V. Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. **Clin. Biochem.**, v.37, n.1, p.1-9, 2004.
- VERPLANKE, A. J.; HERBER, R. F.; DE WIT, R.; VEENHOF, C. H. Comparison of renal function parameters in the assessment of cisplatin induced nephrotoxicity. **Nephron.**, v. 66, n.3, p. 267-272, 1994.
- VIANNA, L.M.; PAIVA A.C.M.; PAIVA T.B. Treatment with vitamin D3 reduces blood pressure of SHR. **Gen. Hypertension.**, v.218, p.589-91, 1992.

- VINCI, G.; BOTRÉ, F.; MELE, G. Ascorbic acid in exotic fruits a liquid chromatography investigation. **Food Chem.**, v. 53, p. 211-214, 1995.
- WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat. Rev. Drug. Disco.** v.4; n.4, p. 307-320, 2005.
- WEIJL, N.I., CLETON, F.J. A; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treat. Rev.** v.23, n.4, p.209-240, 1997.
- WEISEL, T.; BAUM, M.; EISENBRAND, G.; DIETRICH, H.; WILL, F.; STOCKIS, J.P.; KULLING, S.; RUFER, C.; JOHANNES, C.; JANZOWSKI, C. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands, **Biotechnol. J.**, v.1, n.4, p. 388–397, 2006.
- WILMS, L.C.; BOOTS, A.W.; BOER, V.C.; MAAS, L.M.; PACHEN, D.M.; GOTTSCHALK, R.W.; KETELSLEGERS, H.B.; GODSCHALK, R.W.; HAENEN, G.R.; SCHOOTEN, F.J.V.; KLEINJANS, J.C. Impact of multiple genetic polymorphisms on effects of a 4-week blueberry juice intervention on ex vivo induced lymphocytic DNA damage in human volunteers **Carcinogenesis.**, v. 28, n.8, p. 1800–1806, 2007.
- WITTE, I.; PLAPPERT, U.; De WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 97, n. 1, p. 21-26, 2007.
- YAMORI, Y.. Animal models for hypertension. **Nippon Rinsho.** n.42, v2, p.258-270, feb.1984.
- YILDIRIM, Z.; SOGUT, S.; ODACI, E.; IRAZ, M.; OZYURT, H.; KOTUK, M.; AKYOL, O. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 47, n.2, p. 149-156, 2003.
- ZHANG, J. G.; LINDUP, W. E. Role of mitochondria in cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. **Biochem. Pharmacol.**, v. 45, n.11, p. 2215-2222, 1993.
- ZHINSHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chem.** v.64, n.1-2, p.555-559, 1999.
- ZIBADI, S.; WATSON, R.R. Passion fruit (*Passiflora edulis*): composition, efficacy and safety [review]. **Evid. Based. Integrative. Med.** v.3, p.183-87, 2004.
- ZIBADI, S.; REZA, F.; MORIGUCHI, S.; LU, Y., FOO., L.Y.; TEHRANI, P.M.; URLREICH, J.B.; WATSON, R.R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nut. Research**, v. 27, p. 408-416, 2007.
- ZUHAIR, H.A.; EL-FATTAH, A.A.A.; EL-SAYED, M.L. Pumpkin-seed oil modulates the effect of felodipine and captopril in spontaneously hypertensive rats. **Pharmacol. Research.** v.41, n.5, p.555-563, 2000.

ANEXO

Anexo 01. Composição de enriquecimento da ração comercial Nuvilab CR-1, Nuvital S.A.

Ingrediente	Por 1000 g	Ingrediente	Por 1000 g
Vitaminas		Minerais	
A	25.200 UI	Ferro	50,00 mg
D ₃	2.100 UI	Zinco	60,00 mg
E	60,00 mg	Cobre	10,00 mg
K ₃	12,50 mg	Iodo	2,00 mg
B ₁	14,40 mg	Manganês	60,00 mg
B ₂	11,00 mg	Selênio	0,05 mg
B ₆	12,00 mg	Cobalto	
B ₁₂	60,00 µg		
Niacina	60,00 mg	Aminoácidos	
Ácido pantotênico	112,00 mg	Lisina	100,00 mg
Ácido fólico	6,00 mg	Metionina	300,00 mg
Biotina	0,26 mg		
Colina	1.100 mg		

Anexo 02. Componentes bioativos da polpa de maracujá amarelo separados, identificados e quantificados por HPLC-PDA (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de diodo)

Componentes	Concentração mg/100g	Componente Majoritário mg/100g	Metodologia
Ácido Ascórbico	6,96 ± 0,25	-	SOUZA et al., 2004
Carotenóides Totais	3,17 ± 0,03	ζ-caroteno* (1,67), β-caroteno* (1,38)	De ROSSO e MERCADANTE, 2007
Flavonóides Totais	14,2 ± 0,24**	apigenina 3-rhamnoside (4,01), kaempferol (1,78) luteolina 3-glicoside (3,63), quercetina (2,21) ácido siríngico (5,43), ácido cafeico (2,48), ácido cumarínico (1,35)	ZHISHEN et al., 1999 SINGLETON e ROSSI, 1965
Fenólicos Totais	32,4 ± 0,12***		

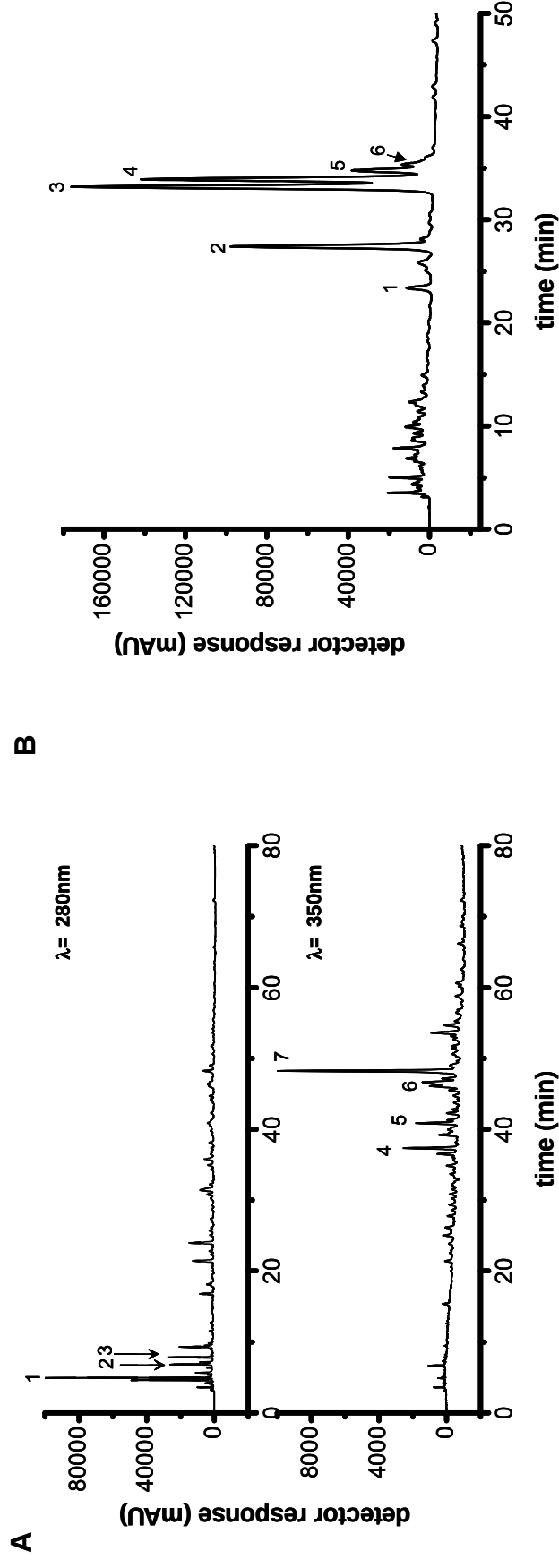
Os valores estão representados como média e desvio padrão das análises em triplicata

* Soma de all-trans + isômeros cis

** (mg catequina/100g)

*** (mg ácido gálico/100g)

Anexo 03. Cromatogramas obtidos por HPLC-PDA (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de diodo)



A) Cromatogramas obtidos por HPLC-PDA, de polifenóis da polpa de maracujá amarelo. Processadas a 280 e 350 nm. Picos de identificação: 1. ácido siríngico, 2. ácido caféico, 3. ácido cumarínico, 4. quercetina, 5. kaempferol, 6. luteolina-3 glicoside, 7. apigenina-3 ramnoside.

(B) Cromatogramas obtidos por HPLC-PDA, de carotenóides da polpa de maracujá amarelo. Processadas a 400 nm. Picos de identificação: 1. all- trans- β -criptoxantina, 2. 15-cis- ζ -caroteno, 3. all-trans- ζ -caroteno, 4. all-trans- β -caroteno, 5. 9-cis- ζ -caroteno, 6. 9-cis- β -caroteno.

Anexo 04. Comitê de ética.

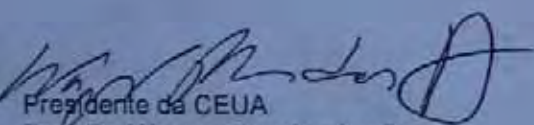
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 06.1.994.53.4), intitulado: "Efeito do Suco de Maracujá sobre os Danos Citotóxicos e Nefrotóxicos em Ratos Espontaneamente Hipertensos", de autoria de **Eliziane Mieko Konta**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus de Ribeirão Preto – USP* foi aprovado em reunião da CEUA de 08.02.07.

Ribeirão Preto, 12 de fevereiro de 2007


Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos


Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602-4469 – Fax: (16) 3633 7964