

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JULIANA MACEDO DELARMELINA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMUTAGÊNICA DA
IPRIFLAVONA CONTRA OS DANOS INDUZIDOS POR
CICLOFOSFAMIDA**

VITÓRIA

2012

JULIANA MACEDO DELARMELINA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMUTAGÊNICA DA
IPRIFLAVONA CONTRA OS DANOS INDUZIDOS POR
CICLOFOSFAMIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci.

VITÓRIA

2012

JULIANA MACEDO DELARMELINA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMUTAGÊNICA DA
IPRIFLAVONA CONTRA OS DANOS INDUZIDOS POR
CICLOFOSFAMIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 05 de março de 2012.

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo P. Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Flavia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador interno

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin-Morales
UNESP/Rio Claro-SP
Examinador externo

VITÓRIA

2012

A minha **família**, com carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais e irmão pela compreensão, apoio e força, pelos dias distante que sempre souberam estar presente.

A meu avô, José Dellarmelina, motivação inicial de minha escolha e que mesmo tão distante, soube se fazer presença. Saudades.

Ao Jefferson, pelo companheirismo e amor durante todo esse período.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci, pela dedicação, amizade e confiança depositados em mim! Muito obrigada por oportunizar a realização de toda a pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a Dr^a Flávia de Paula e Maria Aparecida Marin-Morales, pela gentileza em aceitar compor a banca de avaliação deste trabalho.

À professora Silvana por ter emprestado o espectrofotômetro para a realização de parte da pesquisa.

Ao professor Ms. Saulo Morellato pelo auxílio na estatística.

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica, pela amizade, convivência e ajuda em muitos momentos: Anny, Irany, Luciano, Jean, Patrícia, Tatiane, Thaty e Urraca.

À turma 2010 do PPG Biotecnologia pelos momentos que passamos.

A todos os funcionários e professores do PPG Biotecnologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

*“As pessoas que acreditam em nossa capacidade fazem mais do que apenas incentivar.
Elas criam para nós uma atmosfera que favorece nosso sucesso”.*

John Spalding

RESUMO

Ipriflavona é uma isoflavona sintética derivada da daidzeína e utilizada no tratamento e prevenção da osteoporose em mulheres pós-menopausadas. Investigamos o potencial dessa droga contra os efeitos citotóxico e mutagênico induzidos pelo quimioterápico ciclofosfamida (CPA), por meio do ensaio do micronúcleo em eritrócitos de medula óssea de camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)* *in vivo*. Para avaliar um de seus possíveis mecanismos de ação realizamos a avaliação de sua atividade antioxidante pelo método de DPPH. Para os testes *in vivo* foram realizados três protocolos: pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento. A ipriflavona foi avaliada em três concentrações dissolvidas em DMSO (1,71; 8,57 e 42,85mg.kg⁻¹ m.c) e administrada via oral. A medula óssea foi coletada para a avaliação dos eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) e da razão PCE/(PCE+NCE) (eritrócitos policromáticos/eritrócitos policromáticos + eritrócitos normocromáticos). Para o teste de DPPH foram avaliadas 5 concentrações de ipriflavona (500, 250, 150, 50 e 10µg.mL⁻¹) utilizando solução de DPPH 60µM. Os resultados obtidos nos testes *in vivo* demonstram que a ipriflavona nas três concentrações pesquisadas reduziu significativamente a frequência de MNPCEs induzidos pela CPA no protocolo de pré-tratamento e demonstrou o mesmo efeito nas concentrações de 1,71 e 42,85mg.kg⁻¹ m.c, no pós-tratamento. Entretanto, no tratamento simultâneo, ela não reduziu a frequência de MNPCE em nenhuma das concentrações testadas. Em todos os protocolos realizados houve o aumento da razão PCE/(PCE+NCE), demonstrando sua eficácia na redução da citotoxicidade induzida pela CPA. Houve variação entre os gêneros em alguns dos grupos experimentais. A avaliação da atividade antioxidante da ipriflavona revelou sua ausência de capacidade em doar hidrogênios para o radical DPPH, sugerindo que a mesma atua por meio de outros mecanismos, como por exemplo, inativação da atividade enzimática das isoenzimas do citocromo P-450.

Palavras-chave: Ipriflavona. Antimutagenicidade. Ciclofosfamida. Ensaio do micronúcleo. DPPH.

ABSTRACT

Ipriflavone is a synthetic isoflavone derivative from daidzein and clinically prescribed for treating and preventing osteoporosis in postmenopausal women. We investigated the potential of this drug against the cytotoxic and mutagenic effects induced by cyclophosphamide (CPA) chemotherapy, using the micronucleus assay in bone marrow erythrocytes of Swiss albino mice (*Mus musculus*) *in vivo*. To evaluate their possible mechanisms of action, performed the evaluation of antioxidant activity by DPPH assay. For *in vivo* testing was carried out three protocols: pretreatment, simultaneous treatment and post treatment. The ipriflavone was evaluated in three different concentrations dissolved in DMSO (1,71; 8,57 e 42,85mg.kg⁻¹ m.c) and administered by oral via. The bone marrow was collected for the evaluation of polychromatic erythrocytes (PCE) and the ratio PCE/(PCE+NCE) (polychromatic erythrocytes / polychromatic erythrocytes + normochromatic erythrocytes). For the DPPH test were assessed five concentrations of ipriflavone (500, 250, 150, 50 e 10µg.mL⁻¹) using DPPH solution (60µM). The results of *in vivo* tests show that the three concentrations of ipriflavone studied significantly reduced the frequency of MNPCEs induced by CPA, in the pre-treatment protocol and demonstrated the same effect at the concentrations of 1,71 e 42,85mg.kg⁻¹ m.c in the post-treatment. However, simultaneous treatment did not reduce the frequency of MNPCE in any of the concentrations tested. In all protocols performed, the ratio PCE/(PCE+NCE) increased. There was variation between the genders in some of the experimental groups and the evaluation of antioxidant activity of ipriflavone showed no ability to donate hydrogens, suggesting that it acts through other mechanisms, such as inactivation of the enzyme activity of cytochrome P-450.

Keywords: Ipriflavone. Antimutagenicity. Cyclophosphamide. Micronucleus assay. DPPH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica das isoflavonas e sua semelhança com o hormônio 17 β -Estradiol humano..	15
Figura 2 – Estrutura química das principais isoflavonas encontradas: genisteína, daidzeína e gliciteína.....	16
Figura 3 – Estrutura química da ipriflavona e de sua precursora daidzeína.....	19
Figura 4 – Estrutura química da ipriflavona e de seus principais metabólitos.	20
Figura 5 – Algumas das ligações cruzadas que podem ocorrer entre um agente alquilante bifuncional e o DNA.	28
Figura 6 – Estrutura química da ciclofosfamida.....	29
Figura 7 – Metabolismo da ciclofosfamida	30
Figura 8 – Reação entre o radical DPPH e a amostra testada.....	34
Figura 9 – Fotomicrografia de Eritrócito Policromático Micronucleado (MNPCE)	36
Figura 10 – Processo de eritropoiese que ocorre na medula óssea	36
Figura 11 – Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo.	37
Figura 12 – Esquema representativo do protocolo de pré-tratamento.	43
Figura 13 – Atividade antioxidante da ipriflavona e do padrão rutina demonstrada pela porcentagem de inibição do DPPH	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais (n=10/grupo)	42
Tabela 2 – Efeitos da administração da ipriflavona na frequência de MNPCE por 1000 células (média $\pm$ EP), na relação de PCE/(PCE+NCE) e a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de pré-tratamento	49
Tabela 3 – Efeitos da administração da ipriflavona na frequência de MNPCE por 1000 células (média $\pm$ EP), na relação de PCE/(PCE+NCE) e a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de tratamento simultâneo	52
Tabela 4 – Efeitos da administração da ipriflavona na frequência de MNPCE por 1000 células (média $\pm$ EP), na relação de PCE/(PCE+NCE) e, a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de pós-tratamento... ..	53

LISTA DE SIGLAS

Abs ₀	absorbância do controle
Abs ₁	absorbância da amostra
ANOVA	análise de variância (do inglês <i>analysis of variance</i>)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CN	controle negativo
CP	controle positivo
CPA	ciclofosfamida
CS	controle do solvente da droga
CYP	citocromo P450 (do inglês <i>cytochrome P450</i>)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPPH-H	difenil-picril-hidrazina
EP	erro padrão
ER	espécies reativas
EUA	Estados Unidos da América
INCA	Instituto Nacional de Câncer
m.c	massa corpórea
MNPCE	eritrócito policromático micronucleado (do inglês <i>micronucleated polychromatic erythrocytes</i>)
N ⁷	nitrogênio 7
NCE	eritrócito normocromático (do inglês <i>normochromatic erythrocytes</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCE	eritrócito policromático (do inglês <i>polychromatic erythrocytes</i>)

RNA	ácido ribonucléico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
TRH	terapia de reposição hormonal
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
v.i	via intraperitoneal
vo.	via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Isoflavonas	15
1.2	Ipriflavona.....	19
1.2.1	Ipriflavona: mutagênese e câncer	22
1.3	Mutagênese: carcinogênese e quimioterapia	23
1.3.1	Câncer: problema de saúde pública	25
1.3.2	Mutagênese versus Quimioterapia	26
1.3.3	Agentes alquilantes: Ciclofosfamida	28
1.4	Antimutagenicidade	31
1.4.1	Antimutagenicidade e atividade antioxidante	33
1.4.2	Antimutagenicidade e o teste do micronúcleo em medula óssea de roedores <i>in vivo</i>	34
2	OBJETIVOS	39
2.1	Geral	39
2.2	Específicos.....	39
3	METODOLOGIA.....	40
3.1	Reagentes	40
3.2	Ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos	40
3.2.1	Agente indutor de danos ao DNA	40
3.2.2	Ipriflavona	41
3.2.3	Animais.....	41
3.2.4	Tratamentos.....	42
3.3.4.1	Pré-tratamento	43
3.3.4.2	Tratamento simultâneo	44
3.3.4.3	Pós-tratamento	44
3.2.5	Preparação citológica e análise	44
3.3	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante pelo método do DPPH	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos	47
4.1.1	Pré-tratamento	47
4.1.2	Tratamento simultâneo	48

4.1.3	Pós-tratamento	50
4.2	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante pelo método do DPPH.....	54
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	66
7	REFERÊNCIAS	688
	ANEXO A	81
	APÊNDICE A	82
	APÊNDICE B.....	83
	APÊNDICE C.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 ISOFLAVONAS

Isoflavonas são compostos químicos fenólicos que compõem uma subclasse dos flavonóides (SARKAR; LI, 2009; SETCHELL, 1998). A característica estrutural básica dos compostos de isoflavona é o núcleo flavona, constituído de dois anéis benzeno (A e B) ligados através de um anel pirano heterocíclico (MESSINA, 1999). Estes compostos bioativos e não nutricionais apresentam semelhança estrutural com o estrogênio humano (Figura 1), 17 β -estradiol, o principal hormônio feminino e, por isso, podem apresentar a capacidade de imitar alguns de seus efeitos ao se encaixar aos receptores de estrogênio, podendo ser também denominados de fitoestrógenos (BROWN, 2000; FERRARI; DEMIATE, 2001).

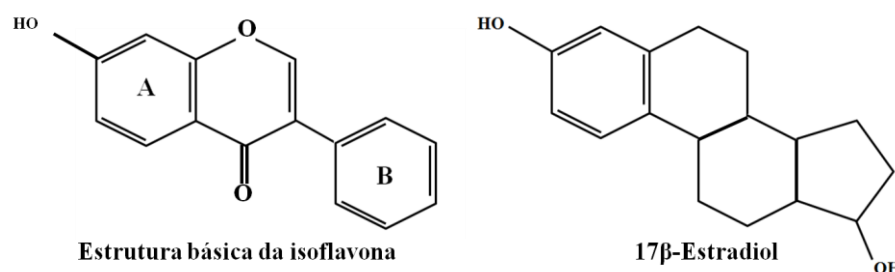


Figura 1: Estrutura básica das isoflavonas e sua semelhança com o hormônio 17 β -Estradiol humano (estrogênio).

Sua distribuição é muito restrita, sendo encontrada em maiores concentrações nas leguminosas e, em particular, na soja (*Glycine max* Merrill) e seus derivados. As principais isoflavonas encontradas são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína (Figura 2), as quais podem apresentar-se conjugadas ou não, como glicosídeos por exemplo, formando daidzina, genistina e glicitina (SARKAR; LI, 2009; SETCHELL, 1998; FERRARI; DEMIATE, 2001).

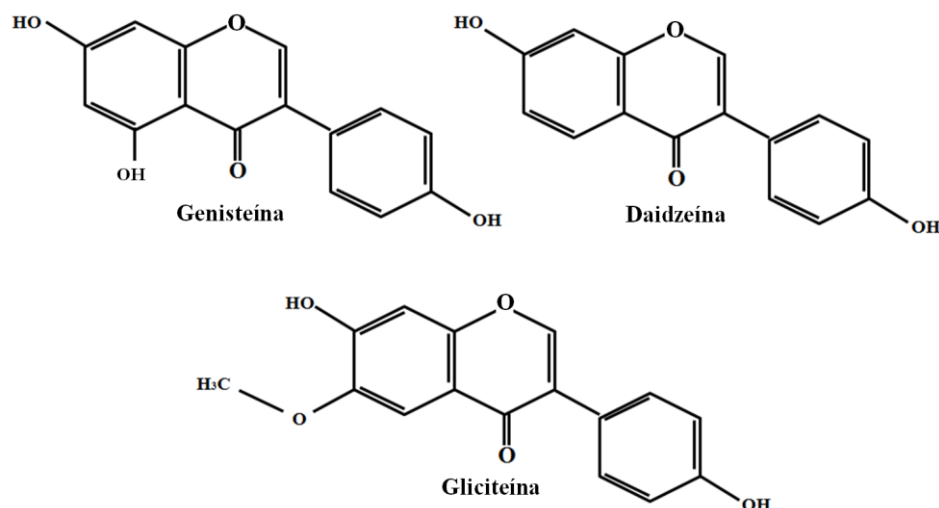


Figura 2: Estrutura química das principais isoflavonas encontradas: genisteína, daidzeína e gliciteína.

Pesquisas demonstram que devido à similaridade estrutural com o 17β -estradiol, a genisteína e a daidzeína ligam-se a receptores de estrógenos (SARKAR; LI, 2009), como demonstrado por Harris et al. (2005), em células de câncer de mama com receptores α e β . Assim, os fitoestrógenos tem potencial para exercer efeitos agonistas (estrogênico) ou antagonistas (anti-estrogênico) dependendo de sua concentração no organismo, do tipo de receptor estimulado, da concentração desses receptores no tecido e do tipo de isoflavona (GALVÃO et al., 2006; MUELLER et al., 2004); além de serem benéficos, uma vez que podem reduzir o uso de estrógenos potencialmente nocivos à saúde, se tornando, muitas vezes, uma alternativa em substituição ou complementação da reposição hormonal em mulheres menopausadas (FERRARI; DEMIATE, 2001).

Observa-se que há um receio das mulheres em relação à terapia de reposição hormonal (TRH) convencional para o alívio dos sintomas da menopausa, uma vez que a mesma pode ocasionar efeitos adversos como mastalgias e sangramentos irregulares (GALVÃO et al., 2006), além de agir de forma a promover as fases da carcinogênese e facilitar a proliferação de células malignas (COLDITZ, 1998), aumentando o risco de desenvolver neoplasias, especialmente as de mama, ovário e endométrio (GARNET et al., 2003; GRADY et al., 1995). Estudos realizados por pesquisadores do *Women's Health Initiative* demonstraram que os riscos globais da TRH superam seus benefícios (ANDERSON et al., 2004; ROSSOUW et al., 2002),

neste sentido, a utilização dos fitoestrógenos pode ser uma importante estratégia para o alívio dos sintomas da menopausa decorrentes do hipoestrogenismo (ALDRIGHI et al., 2002), além de ser benéfica na prevenção, a longo prazo, da osteoporose, doenças cardíacas e câncer (COLDITZ, 1998).

Tem sido reportado que isoflavonas regulam a expressão de diversos genes que estão relacionados à regulação hormonal, diferenciação e crescimento celular, organogênese, metabolismo ósseo e lipídico, imunidade, transdução de sinal e transcrição (SARKAR; LI, 2009), que podem influenciar muitos processos fisiológicos e bioquímicos.

Há evidências epidemiológicas e experimentais de que esses compostos tenham propriedades biológicas importantes, em adição a sua atividade estrogênica e/ou antiestrogênica, protegendo o organismo contra algumas doenças crônicas, em especial o câncer (FERRARI; DEMIATE, 2001; SARKAR; LI, 2009).

Estudos demonstram que existe uma diferença significativa na incidência de algumas doenças crônicas entre os diferentes grupos étnicos, e essa diferença tem sido parcialmente atribuída a fatores dietéticos (VAREZ-LENON et al., 2006, apud SARKAR; LI, 2009). Nas populações que consomem dietas ricas em isoflavonas a incidência de determinados tipos de câncer (cólo, mama e próstata, principalmente), doenças cardíacas e osteoporose é menor, quando comparada com a incidência em populações que não consomem esses tipos de alimentos (FERRARI; DEMIATE, 2001; POTTER et al., 1998, apud ESTEVES; MONTEIRO).

De fato, estudos experimentais têm demonstrado muitos efeitos benéficos das isoflavonas, em diferentes aspectos da saúde. Allison et al. (2003) e Fontaine et al. (2003) demonstraram seus benefícios na perda de massa de gordura e redução das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) do sangue, o que reflete na redução do risco de doenças cardiovasculares, dos problemas com pressão arterial e aterosclerose (BRONS, 2002; FERRARI; DEMIATE, 2001; JENKINS et al., 2002). Além disso, estudos demonstram seus benefícios no tratamento de diabetes e osteoporose em mulheres pós-menopausadas, principalmente no que se trata à prevenção da perda de massa óssea (BHATHENA; VELASQUEZ, 2002; FERRARI; DEMIATE, 2001; YE, et al., 2006;).

Nas mulheres asiáticas, os benefícios são ainda mais evidentes, principalmente no alívio dos sintomas do climatério e menopausa (ESTEVES; MONTEIRO, 2001; BROUNS, 2002). Os baixos índices de mortalidade causada por câncer de mama entre as mulheres nesses países e o efeito antiestrogênico das isoflavonas alimentam a especulação de que a ingestão de alimentos de soja reduz o risco de desenvolvimento da doença (FERRARI; DEMIATE, 2001).

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que as isoflavonas, especificamente a genisteína e daidzeína, apresentam propriedades anticarcinogênicas, sendo reconhecidas como agentes quimiopreventivos do câncer por inibir a iniciação do tumor (ESTEVES; MONTEIRO, 2001; REGITANO-D'ARCE, 2006; SURH, 2003). Barnes (1995), por exemplo, demonstrou que isoflavonas são capazes de inibir a carcinogênese e o crescimento de células cancerígenas *in vivo* e *in vitro*, além de ter propriedade antiangiogênica em diversos tipos tumorais (SASAMURA et al., 2004; BÜCHLER et al., 2004).

Além da capacidade de inibir a iniciação e muitas vezes a progressão da carcinogênese, dados *in vivo* e *in vitro* demonstram que isoflavonas e seus derivados podem aumentar a eficácia de alguns agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer (SARKAR; LI, 2008; SARKAR; LI, 2006).

Estudos ainda demonstram o efeito protetor das isoflavonas frente aos diferentes tipos de agentes causadores de danos ao DNA (mutagênicos), apresentando assim, atividade antimutagênica (BERHOW et al., 2000; HUNG et al., 2007)

Os mecanismos relacionando carcinogênese e isoflavonas ainda são alusivos; no entanto, algumas pesquisas têm elucidado que esses compostos exercem atividade antitumoral através da regulação de diferentes caminhos de transdução da sinalização celular que estão envolvidos no desenvolvimento e progressão do tumor; na prevenção de danos oxidativos causados por espécies reativas; na produção de hormônios esteróides (ligados ao desenvolvimento de muitos tumores); e na inibição enzimática, principalmente das enzimas topoisomerase I e II e as tirosinas quinases (CAI; WEI, 1996; ESTEVES; MONTEIRO, 2001; REGITANO-D'ARCE, 2006; RÜFER; KULLING, 2006; SARKAR; LI, 2006).

Assim, pode-se inferir que estas moléculas agem reduzindo a incidência de neoplasias e até mesmo o início do processo de carcinogênese por diversos mecanismos, principalmente por suas propriedades quimiopreventivas e/ou antimutagênicas, podendo assim reduzir as taxas de mortalidade por câncer e outras doenças crônicas relacionadas às mutações.

1.2 IPRIFLAVONA

A Ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona ou 7-isopropoxi-isoflavona) é uma isoflavona sintética derivada da daidzeína (Figura 3), estruturalmente semelhante ao hormônio esteróide, no entanto com atividade estrogênica fraca (LEITE, 1999; MARKIEWICZ et al., 1993). É clinicamente utilizada em alguns países para tratamento e prevenção da osteoporose pós-menopáusia (AGNUSDEI; BUFALINO, 1997), a forma mais frequente de osteoporose encontrada atualmente entre as mulheres (CASTILHO et al., 2009).

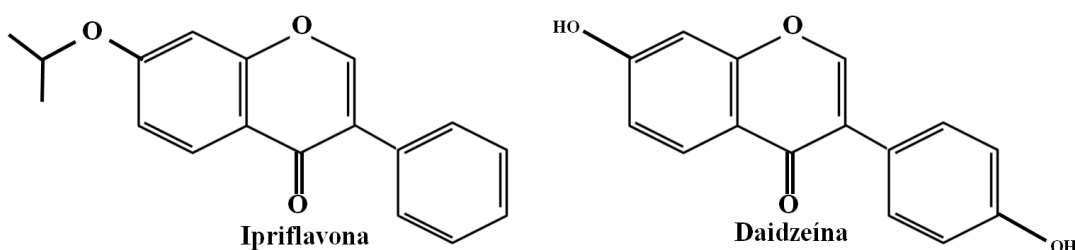


Figura 3: Estrutura química da Ipriflavona e de sua precursora daidzeína.

Esta droga é extensivamente metabolizada no fígado por oxidação do grupo isopropil ou a hidroxilação do anel β , seguida pela glucuronização ou sulfatação, resultando em sete metabólitos (M1-M7, Figura 4), dentre os quais, a daidzeína. Em humanos, os metabólitos M1, M2 (daidzeína), M3 e M5 são predominantes e encontrados em maiores concentrações no plasma sanguíneo, enquanto a ipriflavona inalterada (7-isopropoxi-isoflavona) está presente em menores

concentrações. Sua excreção é realizada pela urina, e não há relatos de acúmulo no corpo ou órgãos específicos (REGINSTER, 1993; HEAD, 1999; LEE et al., 2009).

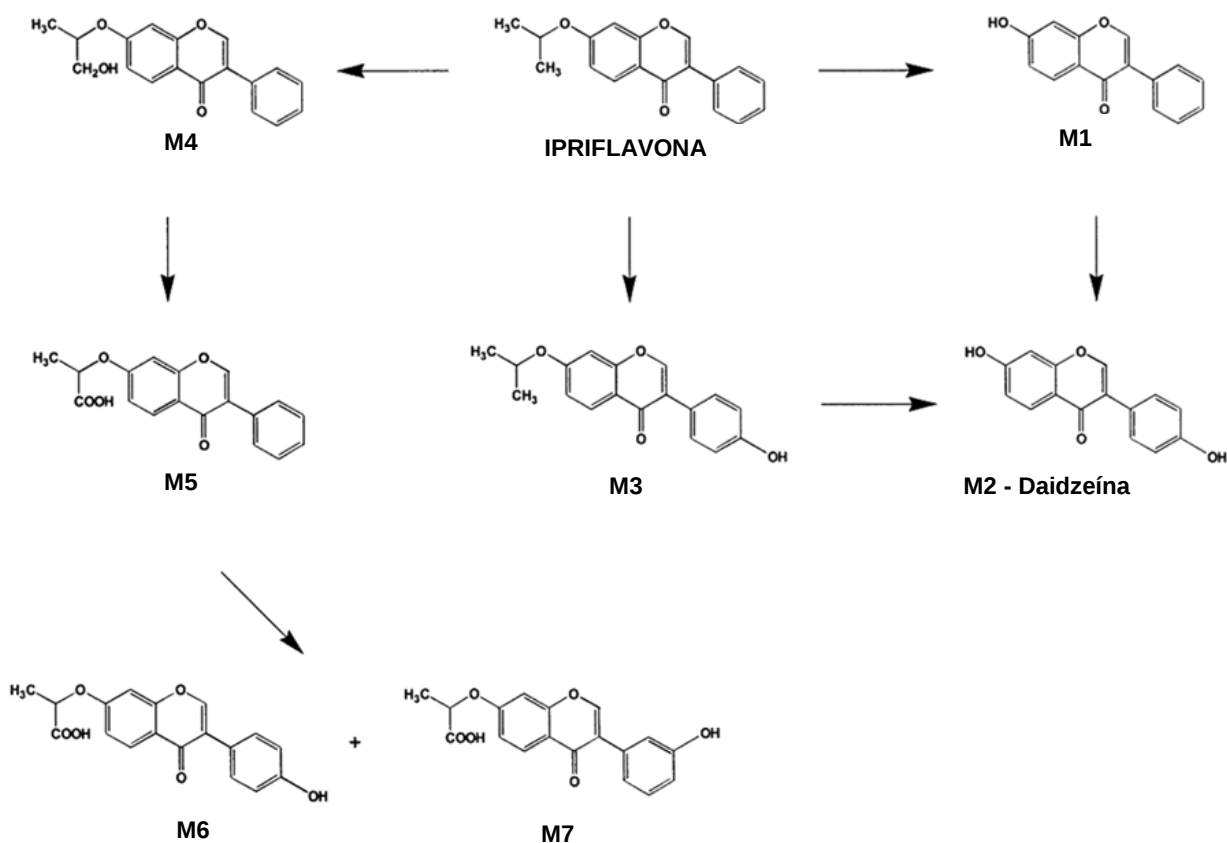


Figura 4: Estrutura química da ipriflavona e de seus principais metabólitos. Fonte: Kim; Lee (2002).

A atuação das isoenzimas do citocromo P-450 é essencial para o metabolismo da ipriflavona. Segundo Chung e colaboradores (2006), essa droga é metabolizada principalmente via citocromo P-450 (CYP) 1A1, 1A2 e 2C11 do fígado. Alguns estudos ainda demonstram sua atuação inibindo ou estimulando a expressão de algumas isoenzimas que compõem o citocromo P-450, o que, em alguns casos, pode influenciar na biodisponibilidade de algumas drogas (CHUNG et al., 2008; MONOSTORY et al., 1998; MONOSTORY; VERECZKEY, 1996).

A ipriflavona, atualmente, tem sido indicada predominantemente para o tratamento de distúrbios relacionados ao metabolismo ósseo. Estudos clínicos, realizados em

mulheres com falência ovariana, demonstram seus efeitos benéficos no aumento da densidade mineral óssea (AGNUSDEI et al., 1997, AGNUSDEI et al., 1992a; VALENTE et al., 1994) e na prevenção da perda de massa óssea (ADAMI et al., 1997; AGNUSDEI et al., 1989; GAMBACCIANI et al., 1993; GENNARI et al., 1997, 1998). Tais efeitos, segundo os autores, se devem principalmente à redução da taxa de reabsorção óssea, que ficou evidenciada por meio de análises dos marcadores bioquímicos resultantes do metabolismo ósseo alterado.

A inibição da reabsorção óssea também foi demonstrada em vários modelos tanto *in vitro*, em cultura de células de ossos longos fetais, como *in vivo*, em ratos machos ou em fêmeas ovariectomizadas (REGINSTE, 1993; TSUDA et al., 1986; CECCHINI et al., 1997). No entanto, os mecanismos de ação da droga sobre a reabsorção não estão totalmente elucidados. Evidências apontam que tal ação ocorre devido à sua atuação na inibição da formação de osteoclastos e na estimulação da síntese, crescimento e diferenciação dos osteoblastos (ARJMANDI et al., 2000; BENVENUTI et al., 1991; BONUCCI et al., 1992a,b; CHENG et al., 1994; CIVITELLI, 1997; MORITA et al., 1992; MIYAUCHI et al., 1996).

A ipriflavona também se demonstra eficaz na diminuição da dor óssea, em idosas com fratura vertebral e em pacientes com doença de Paget, um distúrbio crônico esquelético caracterizado por um aumento da remodelação óssea, no qual áreas de ossos apresentam um crescimento anormal e tornam-se mais frágeis (AGNUSDEI; BUFALINO, 1997; AGNUSDEI et al., 1992b; BANDEIRA et al., 2010).

Estudo realizado por Agnusdei e Bufalino (1997) demonstra que algumas reações adversas podem ocorrer durante o uso prolongado da ipriflavona, como por exemplo, alterações nos parâmetros hematológicos. Alexandersen e colaboradores (2001) também observaram alterações hematológicas, em que o uso prolongado da ipriflavona induziu linfocitopenia em um número significativo de mulheres. Além disso, os autores observaram que a droga não preveniu perda óssea ou afetou marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, obtendo conclusões contrárias aos resultados de outros pesquisadores.

Alguns estudos ainda sugerem que a ipriflavona combinada a baixas doses de estrogênio seria a melhor alternativa para minimizar os efeitos da menopausa e

prevenir a osteoporose (ARJMANDI et al., 2000; GAMBACCIANI et al., 1993), uma vez que, a ipriflavona sem a utilização de hormônios não seria suficiente para reduzir o risco de osteoporose no futuro, tornando-se assim apenas uma alternativa para a complementação da TRH (HEAD, 1999; KATASE et al., 2001).

1.2.3 Ipriflavona: mutagênese e câncer

Existem poucos trabalhos relacionando ipriflavona com mutagênese e/ou carcinogênese. Belcavello et al. (2012) demonstraram que a ipriflavona não apresenta efeitos mutagênicos, utilizando o teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos *in vivo*, evento esse importante para a iniciação da carcinogênese. Em contrapartida, estudos realizados pelos mesmos pesquisadores, com cultura de linfócitos humanos *in vitro*, demonstraram efeitos mutagênico e citotóxico, recomendando o uso dessa droga com cautela, uma vez que seus riscos, bem como seus benefícios, para a saúde humana, ainda não foram completamente elucidados.

Estudos realizados com culturas de células epiteliais gástricas de ratos demonstraram que a ipriflavona, em baixas concentrações, induz a morte celular e a fragmentação do DNA dessas células (TANI et al., 2004), o que embasa os efeitos colaterais gastrointestinais relatados em muitas pesquisas (ADAMI et al., 1997; AGNUSDEI et al., 1997; GENNARI et al., 1998,1997).

Outros experimentos realizados *in vitro*, com células MDA-231, de câncer de mama, e *in vivo*, com células MDA-231 injetadas intracardialmente em camundongos atímicos ICR-nu/nu, suportam alguns benefícios da ipriflavona em relação ao câncer, demonstrando-se efetiva na inibição da síntese de DNA e proliferação de células de câncer de mama (sem a indução de apoptose) e na redução da possibilidade de metástase óssea osteolítica, prolongando a vida dos camundongos portadores de tumor (IWASAKI et al., 2002).

Com base em todos os benefícios que a utilização da ipriflavona oferece, em especial às mulheres pós-menopausadas, em sua ausência de atividade mutagênica *in vivo* e na similaridade estrutural química que possui com as isoflavonas da soja, a

investigação sobre seus aspectos antimutagênicos, frente a um agente antineoplásico, como a ciclofosfamida, é de grande valia para auxiliar na elucidação de seus benefícios e/ou malefícios, quanto a prevenção de injúrias ao material genético celular.

1.3 MUTAGÊNESE: CARCINOGÊNESE E QUIMIOTERAPIA

Mutações, espontâneas ou induzidas, são a causa de defeitos metabólicos inatos no sistema celular, o que pode provocar morbidade e mortalidade na vida dos organismos (BHATTACHARYA, 2011). Há cada vez mais evidências de que mutações em células somáticas estão envolvidas na gênese de doenças relacionadas a desordens genéticas como aterosclerose, acidente vascular cerebral, alguns tipos de diabetes, Alzheimer e câncer (BHATTACHARYA, 2011; DeFLORA et al., 1996; WATERS et al., 1996).

O câncer é uma doença que possui um processo complexo e multifásico, em que a transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena envolve uma variedade de fatores, incluindo alterações genéticas e epigenéticas, desequilíbrios de fatores de crescimento, desregulação enzimática ou em rotas enzimáticas, entre outros (BRASILEIRO FILHO, 2004; SORIA et al., 2003). O distúrbio é caracterizado pela rápida proliferação celular resultante do acúmulo de eventos (mutações) que afetam a expressão de múltiplos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, o que acarreta o descontrole da divisão e diferenciação com consequente desbalanço da replicação e morte celular (RUDDON, 2007; MOREIRA et al., 2004).

A transformação de uma célula normal em uma cancerígena parece ser devido a aberrações em sistemas regulatórios centrais para a fisiologia celular normal (COOPER, 1995) e é o resultado da interação entre fatores endógenos (genéticos, hormonais, imunitários e fisiopatológicos) e três categorias de agentes externos, que incluem agentes físicos, tais como a radiação ultravioleta; químicos, como a fumaça do tabaco; e biológicos, tais como infecções virais. Esses agentes externos otimizam o processo de carcinogênese, uma vez que são potenciais causadores de injúrias ao

material genético. Além disso, o envelhecimento é outro fator determinante no desenvolvimento da doença; constata-se uma relação diretamente proporcional da incidência de casos com o aumento da idade (IARC, 2011).

Nas últimas quatro décadas, múltiplas mudanças genéticas passaram a ser demonstradas por ocorrerem em todos os estágios da carcinogênese e o desenvolvimento do câncer passa então a ser visto como uma continuidade dos eventos mutagênicos e mitogênicos (DeFLORA, 1998).

As mutações que geram as neoplasias podem ocorrer em genes especiais que desempenham um papel causal no desenvolvimento tumoral, como os genes de supressão tumoral e os oncogenes (INCA, 2011a, TSAO et al., 2004). Neste sentido, tem sido demonstrado que a mutagênese tem um papel especial na fase de iniciação da carcinogênese. A substância/agente que atua sobre o DNA pode ser, por si só, mutagênica ou pode ser um produto de um processo metabólico, que normalmente deveria ser inativado ou eliminado (BUNKOVA et al., 2005).

Segundo o Ministério da Saúde (1996), o processo de carcinogênese, ou seja, de formação de um câncer, em geral se dá lentamente podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e seja clinicamente detectável. Esse processo passa por três estágios antes de chegar à constituição do tumor, sendo eles: o estágio de iniciação (primeiro estágio da carcinogênese) em que as células sofrem o efeito dos carcinógenos, que provocam modificações em alguns de seus genes; o estágio de promoção (segundo estágio da carcinogênese) em que as células geneticamente alteradas (iniciadas), sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores, sendo então transformada em uma célula maligna, de forma lenta e gradual; e o estágio de progressão, terceiro e último estágio da carcinogênese, que caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já está instalado evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença.

Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são denominados agentes oncoaceleradores ou carcinógenos. O fumo, por exemplo, é um agente carcinógeno completo, pois possui componentes que atuam nos três estágios da carcinogênese.

1.3.1 Câncer: problema de saúde pública

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 7,6 milhões de mortes (aproximadamente 13% de todas as mortes) em 2008. Atualmente, é a segunda causa de mortalidade por doença na maioria dos países desenvolvidos, ficando atrás apenas das mortes causadas por doenças cardiovasculares (DAY, 2006; DELFINO, 2006; OMS, 2008). No Brasil, segundo o *National Cancer Institute* dos EUA, o câncer é a terceira principal causa de morte, ficando depois das doenças do aparelho circulatório e causas externas (NCI, 2012).

Estima-se que o contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento e o contato crescente com fatores de risco, afetará de forma significativa a incidência de câncer no mundo e que esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento (SILVA, 2010). De fato, evidências epidemiológicas apontam para o aumento da incidência de casos de câncer nos países menos desenvolvidos (DAY, 2006; DELFINO, 2006; OMS, 2008).

A Organização Mundial da Saúde estima que no ano 2030 podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas com câncer no mundo. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam para a ocorrência de 518.510 novos casos (257.870 para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino), dentre os quais, 10.740 ocorrerão no estado do Espírito Santo, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2011c).

Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, configurando-se em evidente problema de saúde pública e econômico mundial. Nos últimos 12 anos, os gastos federais com a assistência oncológica no país quadruplicou, passando de R\$ 470,5 milhões (em 1999) para R\$ 2,2 bilhões (em 2011), com o objetivo de ampliar e melhorar a assistência aos pacientes. Vale destacar que cerca de R\$ 261 milhões foram destinados a prevenção ao câncer que acometem, exclusivamente, as mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Além disso, o governo federal investe anualmente R\$ 2,5 bilhões em pesquisa e produção nacional de produtos oncológicos (SEMERENE, 2011).

Nesse cenário, torna-se fundamental que recursos e esforços sejam direcionados no sentido de orientar as estratégias de prevenção e controle do câncer, bem como a avaliação dos avanços tecnológicos aplicados à prevenção e tratamento, com o objetivo de reduzir a incidência e a mortalidade por câncer, no Brasil e no Mundo (SILVA, 2010).

Sabendo-se que a mutagênese tem um importante papel na iniciação da carcinogênese e que algumas alterações no DNA podem ser removidas por mecanismos de reparo específicos e não específicos, como sistemas enzimáticos endógenos e a utilização de antioxidantes na dieta, é de fundamental importância a busca por agentes que possam reduzir a frequência de danos ao DNA, com propriedades antimutagênicas e/ou anticarcinogênicas, encontrados naturalmente na dieta ou de forma sintética (medicamentos), e que possam ser úteis na prevenção e/ou tratamento do câncer (HALLIWELL, 2007, apud FILHO et al., 2011).

1.3.2 Mutagênese versus Quimioterapia

O tratamento do câncer pode ser realizado utilizando-se diferentes técnicas terapêuticas isoladas ou combinadas (MACHADO, 2000; ROCHE, 2008), que apesar de possuírem mecanismos de ação diferenciados e de serem adequados para diferentes tipos tumorais, possuem o mesmo objetivo, o de erradicar o câncer (ALMEIDA et al., 2005).

Os métodos atuais de tratamento do câncer tem-se mostrado muito eficazes; um terço dos pacientes é curado através de medidas locais cirúrgicas ou radioterápicas, que são muito eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase por ocasião do tratamento. Nos demais casos, todavia, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, e em casos mais avançados, de macrometástases, indicando à necessidade de uma abordagem sistêmica que pode ser efetuada com quimioterapia combinada à cirurgia e/ou a radiação. Atualmente, é possível curar cerca de 50% dos pacientes com câncer, contribuindo, a

quimioterapia, para a cura de cerca de 17% deles (KADAM et al., 2007; SALMON; SARTORELLI, 1995).

A quimioterapia antineoplásica tem desempenhado um papel significativo no tratamento de pacientes com câncer desde os anos 40, quando os primeiros agentes foram estudados (ROCHE, 2008). Normalmente, é a terapia escolhida tanto para o tratamento de doenças no sistema hematopoiético como para tumores sólidos, que apresentam ou não metástases, configurando-se na terapia mais comum contra muitas formas de câncer humano (GENTILE et al., 1998; INCA, 2011b).

No entanto, apesar de seu importante efeito terapêutico, a maioria dos quimioterápicos antineoplásicos atuam de forma não-específica induzindo efeitos colaterais genotóxicos em células não-tumorais, o que pode resultar na formação de outros tumores (BERETTA, 1991, apud GENTILE et al., 1998; INCA, 2011b;) e até mesmo em citotoxicidade nas células “não-alvo”, acarretando irregularidades secundárias (MANZI; KAO, 2008). Isso ocorre, pois as células tumorais não apresentam mecanismos fisiológicos diferenciados das células normais, sendo assim, muitos tecidos normais são também afetados por esses agentes. Dessa maneira, a toxicidade do antineoplásico é refletida não somente no tumor, mas também em tecidos normais de rápida proliferação celular, como a medula óssea, folículo capilar, tecido germinativo, tecido linfóide e epitélio intestinal, o que acarreta em uma série de efeitos colaterais desagradáveis ao paciente, como enjoos e queda de cabelo e obriga a interrupção periódica do tratamento para sua recuperação (INCA, 2011b; KADAM et al., 2007).

Os fármacos antineoplásicos agem interferindo em funções bioquímicas vitais para a célula e, como as diferenças entre as duas populações celulares (tumoral e normal) são mais quantitativas do que qualitativas, eles atuam indistintamente. Com isso, uma linha muito tênue separa o sucesso terapêutico de uma toxicidade inaceitável (INCA 2011b).

Atualmente, o “arsenal” antineoplásico contém cerca de 30 drogas, com alguns agentes adicionais sob investigação, que podem ser classificadas quanto ao seu mecanismo de ação ou mesmo quanto à sua estrutura química e função celular.

Dentre as várias classes de antineoplásicos temos, por exemplo, agentes hormonais, antimetabólicos, antimitóticos, topoisomerase-interativos, antibióticos antineoplásicos e agentes alquilantes (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2011b; KADAM et al., 2007).

1.3.3 Agentes alquilantes: Ciclofosfamida

Os agentes alquilantes são os antineoplásicos mais antigos e comumente utilizados, que comprovadamente reagem com importantes componentes da molécula de DNA, como o grupo fosfato, bases nitrogenadas e enxofre, o que pode acarretar lesões ao DNA de todos os grupos celulares, cancerígenos ou não (ALMEIDA et al., 2005; COLVIN; HAIT, 2009; KADAM et al., 2007). De fato, já é sabido que o DNA é o principal sítio alvo dos agentes alquilantes (KADAM et al., 2007).

Sob condições fisiológicas, os agentes alquilantes são positivamente carregados e atuam como eletrófilos formando ligações covalentes por reação de alquilação com qualquer molécula que esteja carregada negativamente ou que tenha regiões com elevada densidade de elétrons (nucleófilos). Muitos deles são bifuncionais, sendo capazes de estabelecerem ligações cruzadas com a molécula de DNA de três formas diferenciadas, como demonstrado na Figura 5, sendo que, todas elas resultam em lesões na molécula de DNA (KADAM et al., 2007 e ALMEIDA et al., 2005).

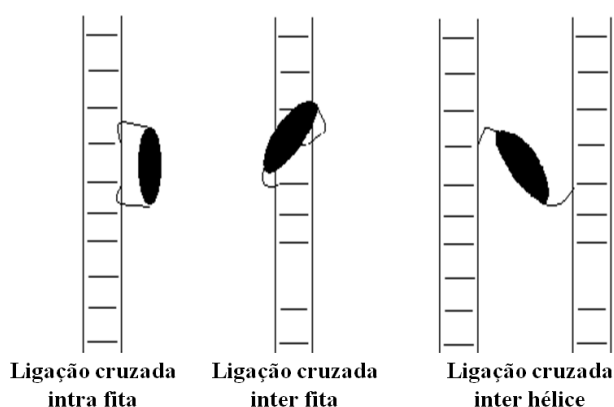


Figura 5: Algumas das ligações cruzadas que podem ocorrer entre um agente alquilante bifuncional e o DNA. Fonte: Almeida et al. (2005).

É importante salientar, no entanto, que nem sempre o agente antineoplásico possui ação ativa direta, sendo administrado como um pró-fármaco que necessita de passar anteriormente pelo processo de metabolização, adquirindo, assim, sua forma farmacológica ativa, citotóxica e mutagênica, que atuará no tecido tumoral e, por vezes, no não tumoral.

Os diferentes tipos de agentes alquilantes podem ser divididos em seis grupos: nitrosureias, triazenos imidazol, alquil sulfonatos, etileniminas, metais pesados e mostardas nitrogenadas (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2011b).

A ciclofosfamida (CPA, Figura 6) é um agente antineoplásico alquilante bifuncional do tipo mostarda nitrogenada, altamente mutagênica, sendo utilizada como imunossupressora e contra muitas formas de cânceres humanos, como linfomas (Hodgkin e não-Hodgkin), leucemias, mieloma, câncer de mama, testículo, endométrio, ovário, entre outros (COLVIN; HAIT, 2009; LANCE et al., 2009; (GENTILI et al., 1998). Sua atuação é principalmente pela alquilação do N⁷ da base nitrogenada guanina (G) no DNA, o que acarreta: erro na codificação (pareamento anormal com a timina); quebra no anel imidazol da G; ligações a pares de G (resultando em ligações cruzadas com as fitas de DNA); e depurinação do DNA, causando quebra em suas fitas (KADAM et al., 2007; SALMON; SARTORELLI, 1995). Dessa maneira, ocasionam uma série de danos ao material genético celular, que poderão até mesmo ser microscopicamente observados.

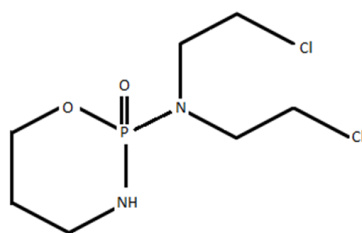


Figura 6: Estrutura química da ciclofosfamida.

No entanto, apesar de sua ampla aplicabilidade terapêutica, a utilização da CPA caracteriza-se por uma série de efeitos adversos que incluem supressão da medula óssea, leucopenia com o aumento do risco de inflamações, cistite hemorrágica,

carcinoma na bexiga, além dos sintomas comuns a muitos outros quimioterápicos, como enjôo e alopecia (LANCE et al., 2009; MANZI; KAO, 2008). Isso se deve a sua atuação inespecífica no que concerne às fases do ciclo celular.

A CPA é administrada como um pró-fármaco e a sua ativação ocorre no fígado, através de sua metabolização, mediada pela hidroxilação no carbono 4 (C-4) feita pelas enzimas oxidases de função mista microsossomais hepáticas (isoenzimas do citocromo P-450), produzindo como composto ativo inicial a 4-hidroxíciclofosfamida, que fica em equilíbrio com o tautômero aldofosfamida. Acredita-se que estes metabólitos ativos sejam transportados pela corrente sanguínea até o tumor e os tecidos normais, onde ocorre a clivagem não enzimática da aldofosfamida às formas citotóxicas mostarda fosforamida, que é o agente alquilante mais reativo da ciclofosfamida e acroleína, que possui elevada toxicidade. O fígado parece ser protegido pela formação enzimática dos metabólitos inativos, 4-cetociclofosfamida e carboxifosfamida, por ação da enzima aldeído desidrogenase (COLVIN; HAIT, 2009; SALMON; SARTORELLI, 1995). Todo o processo de metabolização da ciclofosfamida, em compostos metabolicamente ativos e inativos, estão demonstrados na Figura 7.

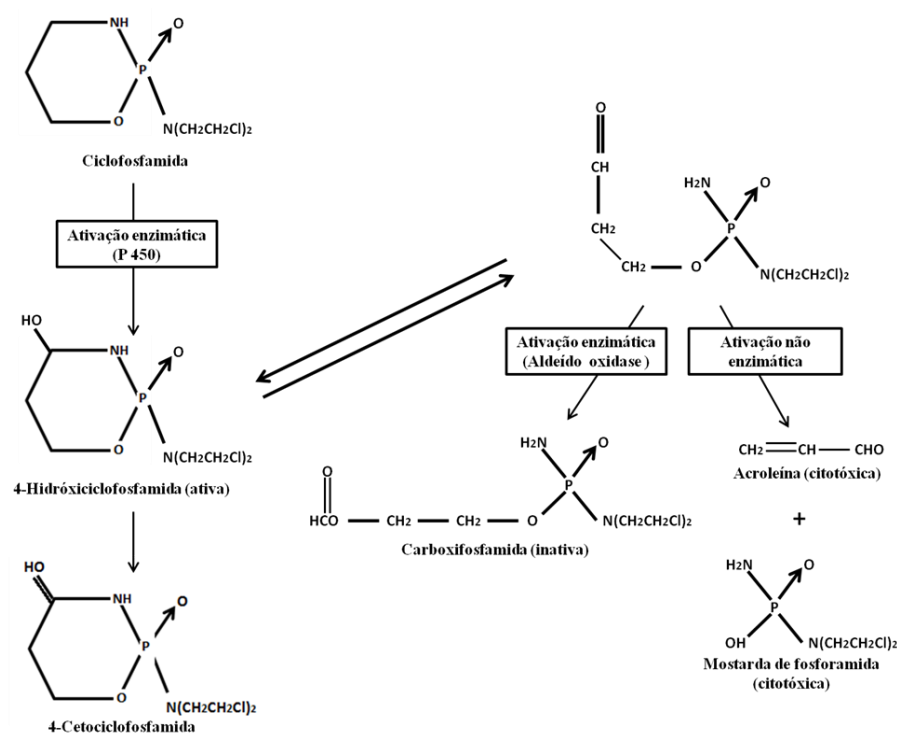


Figura 7: Metabolismo da ciclofosfamida. Fonte: Adaptado de Salmon; Sartorelli (1995).

Para combater os efeitos fisiológicos adversos do tratamento quimioterápico antineoplásico, é comum encontrar pacientes fazendo o uso de uma complementação alimentar e/ou combinação de terapia alternativa (vitamínica, por exemplo). Muitos desses suplementos possuem quantidade de substâncias antioxidantes ou agentes de bloqueio geral que podem não somente diminuir os efeitos fisiológicos colaterais como também proporcionar proteção contra efeitos genotóxicos em células não desejadas (GENTILE et al., 1998; MITSCHER et al., 1996).

1.4 ANTIMUTAGENICIDADE

A prevenção do câncer e de doenças relacionadas às mutações pode ser alcançada evitando-se a exposição à mutágenos reconhecidos, reforçando-se os mecanismos de defesa ou identificando e aumentando a nossa exposição a fatores de proteção (antimutágenos) capazes de diminuir a mutagenicidade de agentes mutagênicos (BHATTACHARYA, 2011; DeFLORA, 1998). Neste cenário, a “quimioprevenção” de mutações e, conseqüentemente, de doenças relacionadas, em especial o câncer, é um importante campo de investigação e a busca de agentes antimutagênicos tem sido uma abordagem promissora para proteção da saúde humana (FERGUSON, 1994; HAYATSU et al., 1988; KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ et al., 2005).

Agentes antimutagênicos são compostos naturais ou sintéticos, capazes de reduzir a frequência ou a taxa de mutações (espontâneas ou induzidas) ou, prevenir que elas ocorram, independente do mecanismo de ação envolvido (GASIOROWSKI et al., 2001b; OLIVEIRA et al., 2009). Esses mecanismos de ação são classificados em dois processos maiores e generalistas, denominados desmutagênese e bioantimutagênese (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

Na desmutagênese, os agentes protetores (desmutágenos) atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA (mutágenos), inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo a ativação metabólica de pró-mutágenos ou sequestrando moléculas reativas (KADA et al., 1978, apud ANTUNES; ARAUJO,

2000). Agentes desmutagênicos são capazes de prevenir a ação do agente indutor do dano, principalmente por sua adsorção e são capazes de inativar os mutágenos total ou parcialmente antes que eles atuem sobre os genes (BHATTACHARYA, 2011; FERGUSON, 1994; OLIVEIRA et al., 2009).

Na bioantimutagênese, por sua vez, os agentes atuam principalmente no reparo das lesões causadas no DNA (KADA et al., 1978, apud ANTUNES; ARAUJO, 2000). Segundo De Flora (1998), os bioantimutágenos atuam dentro das células como moduladores do reparo e da replicação do DNA, estimulando o livre reparo de erros ou inibindo o sistema de reparo sujeito a erros. Eles são capazes de eliminar o processo de mutação após os genes serem afetados pelo mutágeno, o que resulta no declínio da frequência de mutações. Nota-se que muitos agentes antimutagênicos possuem mais de um mecanismo de ação (FERGUSON, 1994), podendo atuar por mecanismos de desmutagênese e de bioantimutagênese.

Independente da classificação, o modo de ação de um composto antimutagênico pode ser por: inibição da absorção e do transporte de agentes genotóxicos; ativação de sistemas celulares que interceptam e desintoxicam mutágenos, estimulando o reparo dos danos ao DNA e/ou erradicando as células danificadas por apoptose; interferência na atividade metabólica de enzimas importantes na ativação e desintoxicação de xenobióticos (enzimas do citocromo P-450, por exemplo); inibição de espécies reativas (ER); prevenção da formação de espécies ativas de pró-fármacos genotóxicos (mutágenos de ação indireta) e que requerem ativação metabólica para uma forma mais eletrofílica que pode reagir com o DNA, entre outros (DeFLORA, 1998; FERGUSON, 1994; QARI, 2008).

Sendo assim, os compostos antimutagênicos podem impedir um agente mutagênico de interagir com o DNA por inativação química ou enzimática, ou ainda reduzir os efeitos adversos dos agentes mutagênicos pela modulação das alterações celulares induzidas, após o dano ao DNA (BUNKOVA et al., 2005).

Ensaio de antimutagenicidade de curto prazo têm sido utilizados de forma eficaz para identificar antimutágenos e anticancerígenos potenciais, oportunizando o desenvolvimento de novos medicamentos a serem utilizados na prevenção e tratamento de neoplasias (GEBHART, 1992). Na prática, a maioria dos ensaios de

mutagenicidade comumente realizados podem ser modificados e empregados para mensurar antimutagenicidade (FERGUSON, 1994).

Os sistemas celulares em mamíferos, utilizados para a avaliação da mutagenicidade e/ou antimutagenicidade, abrangem os testes *in vitro* e *in vivo*. Nos testes *in vivo*, são utilizados frequentemente ratos e camundongos. Nos testes *in vitro* são usadas diferentes linhagens celulares, inclusive células humanas, como os linfócitos (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). Em qualquer um desses sistemas testes, o tratamento com o agente mutagênico, que induz as mutações, e o antimutagênico, que poderá inibir o aparecimento de lesões no DNA, pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, por meio de pré- ou pós-tratamento (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). Além disso, existem alguns testes químicos com o objetivo de mensurar a atividade antioxidante de um agente potencial, como o teste de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).

1.4.1 Antimutagenicidade e atividade antioxidante

A ação mutagênica e carcinogênica de diferentes tipos de substâncias genotóxicas envolve a geração de radicais livres reativos ao DNA, o que sobrecarrega os sistemas de defesa antioxidante endógenos, caracterizando o estresse oxidativo. Assim, de modo geral, todos os agentes antioxidantes são potenciais inibidores da mutagênese e carcinogênese, visto que os radicais livres estão envolvidos na iniciação desses processos (FERGUSON, 1994).

Além disso, muitos agentes com atividade antimutagênica também possui atividade antioxidante, como muitos flavonoides, por exemplo (BHATTACHARYA, 2011). Nesse sentido, pode-se dizer que um dos principais grupos de agentes inibidores da mutagênese e carcinogênese é representado pelos antioxidantes (MAMMADOV et al., 2009; MAURO et al., 2010).

Os agentes antioxidantes são substâncias que, mesmo presente em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (MAURO et al., 2010). Durante as três últimas décadas têm surgido formulações de drogas

baseadas em antioxidantes, para a prevenção e o tratamento de algumas doenças associadas às mutações (DEVASAGAYAM et al., 2004).

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), uma vez que é um teste rápido e confiável (DAWIDOWICZ et al., 2012).

O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico e que possui absorbância máxima a 517 nm, apresentando uma coloração púrpura (RUFINO et al., 2007). A coloração muda de púrpura para amarelo (APÊNDICE A), com conseqüente decréscimo da absorbância, quando o radical DPPH é reduzido por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar formando-se o difenil-picril-hidrazina (DPPH-H) (SOUSA et al., 2007). A estabilização do radical DPPH por um substrato, como demonstrada na Figura 8, leva a perda da cor púrpura e serve como um marcador (GAIKWAD et al., 2010).

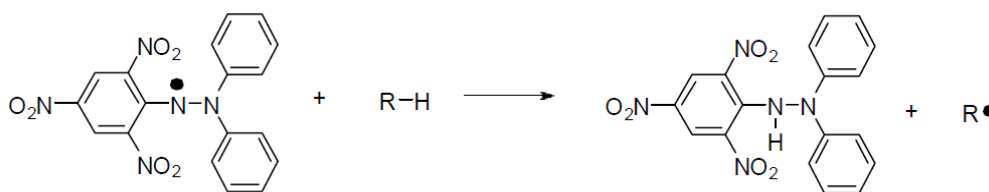


Figura 8: Reação entre o radical DPPH e a amostra testada (R-H) que doa hidrogênio estabilizando o radical livre.

Desse modo, quando a solução de DPPH entra em contato com um substrato que atua como um doador de átomos de hidrogênio por exemplo, há a formação do DPPH-H reduzido com mudança simultânea da cor púrpura para amarelo claro (SZABO et al., 2007).

1.4.2 Antimutagenicidade e teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*

Os estudos de mutagenicidade bem como os de antimutagenicidade constituem um

passo importante na avaliação toxicológica dos medicamentos, onde podem estar presentes compostos que interferem de alguma forma no material genético celular. Dentre os bioensaios de avaliação de mutagenicidade e/ou antimutagenicidade e citotoxicidade preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, a avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea de roedores *in vivo* tem emergido como um dos métodos preferenciais, pois detecta alterações genômicas decorrentes de danos cromossômicos e/ou danos no aparato mitótico, causados por agentes clastogênicos ou aneugênicos, respectivamente (FENECH, 2005; AZEVEDO et al., 2003), além de ser amplamente aceito e recomendado para avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001; RIBEIRO, 2003).

O teste do micronúcleo visa detectar e quantificar a ação mutagênica e/ou antimutagênica de agentes físicos ou químicos (MACGREGOR et al., 1987; RABELLO-GAY et al., 1991). Este ensaio apresenta algumas vantagens em relação aos outros, entre as quais podem ser citadas sensibilidade, custo, confiabilidade e rapidez na execução, além de ser especialmente relevante, pois permite a consideração de fatores como: a absorção, o metabolismo *in vivo*, a cinética do fármaco e o processo de reparo do DNA, o que dificilmente poderia ser reproduzido em ensaios *in vitro* (KRISHNA; HAYASHI, 2000; SATO; TOMITA, 2001).

Em geral, ele permite deduzir que se determinado agente está afetando o material genético do organismo modelo, potencialmente apresentará efeitos similares em qualquer tipo de célula, já que o código genético é universal (ALBERTS et al., 2004).

Os micronúcleos (Figura 9) originam-se de fragmentos cromossômicos acêntricos produzidos por quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros que sofrem retardo em relação aos demais durante a migração para os pólos da célula em anáfase, na divisão celular, muitas vezes devido à disfunção do fuso mitótico (FAGUNDES et al., 2005). São redondos, com até 1/3 do tamanho do núcleo original e não apresenta refringência.

Esse teste pode ser executado praticamente em qualquer população de células que esteja em constante divisão, sendo a medula óssea de mamíferos uma das regiões

mais adequadas, visto que suas células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de divisão celular (HEDDLE, 1973; FAGUNDES et al., 2005). Desse modo, o processo de produção dos eritrócitos (eritropoiese) é parte fundamental no processo de formação do micronúcleo (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

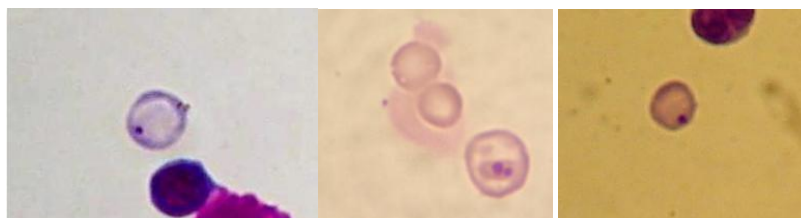


Figura 9: Fotomicrografia do eritrócito policromático micronucleado (MNPCE).

Em roedores adultos, tanto a medula óssea como o baço são órgãos hematopoiéticos em que as células-tronco formam a base do processo de produção de eritrócitos e seus estágios de maturação (Figura 10). Durante a proliferação, as células continuam a se dividir, momento em que uma substância teste administrada (mutágeno) pode agir e causar danos aos cromossomos e nas macromoléculas relacionadas com a disjunção das cromátides, refletindo na formação de um micronúcleo (KRISHINA; HAYASHI, 2000).

Segundo o procedimento original descrito por Heddle (1973), durante a maturação, quando um eritroblasto expelle seu núcleo principal para transformar-se em eritrócito, o micronúcleo formado pode não ser expulso do citoplasma, onde é facilmente identificado.

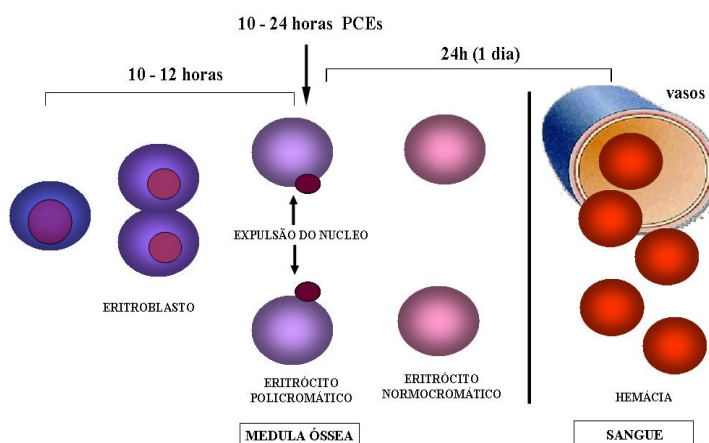


Figura 10: Processo de maturação dos eritrócitos que ocorre na medula óssea. Durante a maturação os eritrócitos policromáticos, que possui ribossomos e é considerado RNA positivo, perdem RNA passando a conter principalmente hemoglobina, tornando-se eritrócito normocromático (RNA negativo). Fonte: Adaptado de Ribeiro (2003).

Por um período de 10 a 24 horas, os eritrócitos jovens são policromáticos (PCE, eritrócito imaturo – RNA positivo e com presença de ribossomos) e coram-se em azul quando em contato com eosina azul de metileno seguindo Leishman e não em vermelho/rosa, como os eritrócitos maduros (eritrócitos normocromáticos, NCE) que perde RNA e passa a conter principalmente hemoglobina. Sendo assim, os micronúcleos são contados somente nos PCEs, uma vez que se forem contados apenas neste tipo de célula haverá a segurança de que eles se formaram na mitose anterior, com a presença do agente mutagênico e/ou antimutagênico.

O aumento da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) no grupo de animais tratados, quando se realiza o ensaio de mutagenicidade, é um indicativo de indução de danos no cromossomo por essa substância como consequência de eventos clastogênicos ou aneugênicos (Figura 11). Ambos os tipos de danos estão associados com a aparência e/ou a progressão do tumor, e com resultados adversos da reprodução e desenvolvimento (KRISHINA; HAYASHI, 2000). Em contrapartida, a diminuição da frequência de MNPCE, quando um agente reconhecidamente mutagênico é utilizado juntamente ou em tempos diferentes com uma determinada substância, indica que essa substância atua protegendo o DNA de possíveis danos, reduzindo a frequência de mutações, sendo, assim, considerada antimutagênica.

No ensaio de micronúcleo, a relação de PCE em relação ao total de eritrócitos (PCE+NCE) entre o grupo de animais tratados e o grupo controle fornece o índice de citotoxicidade, e o número de MNPCE fornece o índice mutagenicidade (KRISHINA; HAYASHI, 2000). A citotoxicidade é indicada por uma redução significativa na percentagem de PCE (RIBEIRO, 2003).

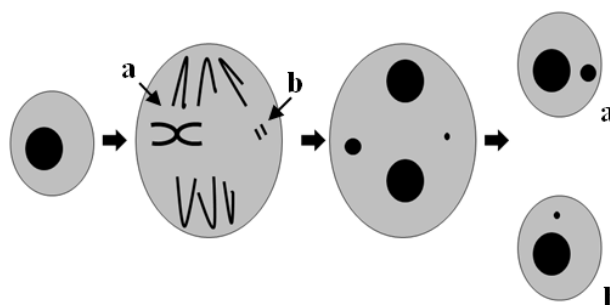


Figura 11: Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de um cromossomo inteiro (a) ou um fragmento cromossômico acêntrico (b). Fonte: Adaptado de Fenech (2005).

Atualmente existe um grande interesse na identificação de substâncias que possuam atividade protetora contra os danos induzidos por agentes mutagênicos, com a finalidade preventiva. De fato, muitos estudos tem sugerido que o uso de antimutágenos e anticarcinógenos na vida cotidiana será o procedimento mais eficaz para a prevenção do câncer e doenças genéticas humanas, principalmente degenerativas (FERGUSON, 1994).

No entanto, para que os agentes antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos potenciais sejam identificados e, posteriormente, disponibilizados comercialmente, é necessário uma demonstração rigorosa de sua eficácia e segurança em animais modelos *in vivo* e, posteriormente, por triagens clínicas (MORSE; STONER, 1993).

Nesse sentido, o presente trabalho apresenta uma triagem inicial, *in vivo*, para a avaliação da ipriflavona como um possível agente protetor do material genético contra aos danos induzidos pelo quimioterápico ciclofosfamida, e testa um de seus possíveis mecanismos de ação, por meio do teste de DPPH.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antimutagênica de diferentes concentrações da ipriflavona contra a mutagenicidade e citotoxicidade induzidas pelo agente antineoplásico ciclofosfamida, por meio por meio da análise da frequência de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)* *in vivo* e investigar um dos seus possíveis mecanismos de ação pelo teste do DPPH.

2.2 Específicos

- Avaliar o efeito antimutagênico da ipriflavona nas concentrações de $1,71\text{mg.kg}^{-1}$, $8,57\text{mg.kg}^{-1}$ e $42,85\text{mg.kg}^{-1}$ através dos protocolos de tratamento simultâneo, pré- e pós-tratamento, por meio da análise da frequência de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos albinos *Swiss (M. musculus)* *in vivo*;
- Avaliar o efeito da ipriflavona ($1,71\text{mg.kg}^{-1}$, $8,57\text{mg.kg}^{-1}$ e $42,85\text{mg.kg}^{-1}$) na redução da frequência de micronúcleos induzidos pela CPA por meio do cálculo da porcentagem de redução de danos;
- Avaliar o efeito da ipriflavona nas concentrações de $1,71\text{mg.kg}^{-1}$, $8,57\text{mg.kg}^{-1}$ e $42,85\text{mg.kg}^{-1}$ contra à citotoxicidade induzida pela CPA nos protocolos de tratamento simultâneo, pré- e pós-tratamento, por meio da relação entre o número de eritrócitos policromáticos e o número total de eritrócitos (eritrócitos policromáticos mais eritrócitos normocromáticos) em células de medula óssea de camundongos albinos *Swiss (M. musculus)* *in vivo*;
- Avaliar a capacidade antioxidante da ipriflavona por meio do teste de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) para respaldar seus possíveis mecanismos de ação;
- Avaliar e comparar os resultados obtidos, nos experimentos *in vivo*, separando-se e combinando-se os gêneros.

3 METODOLOGIA

3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados nesta pesquisa foram: ipriflavona (Sigma-Aldrich, USA); dimetilsulfóxido (Labsynth, Brasil); soro fetal bovino (Gibco-Invitrogen Ltda, Brasil); ciclofosfamida (Genuxal[®], Asta Medica); eosina azul-de-metileno segmento Leishman (Cromoline, Brasil); metanol (Vetec, Brasil) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (Sigma-Aldrich, USA), todos em elevado grau de pureza.

3.2 ENSAIO DO MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS

O ensaio do micronúcleo foi conduzido conforme recomendações descritas por Schmid (1975) e adaptadas por Krishna e Hayashi (2000) com modificações, e de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES, processo 043/2010, ANEXO A).

3.2.1 Agente indutor de danos ao DNA

Como agente indutor de danos ao material genético utilizou-se o agente alquilante de ação indireta ciclofosfamida ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$), diluído em tampão fosfato (PBS) e administrado por via intraperitoneal (v.i) na dose de $50mg.kg^{-1}$ de massa corpórea (m.c). Este quimioterápico possui ativação metabólica no fígado e seus metabólitos provocam potente ação mutagênica.

3.2.2 Ipriflavona

A escolha das doses de ipriflavona ($C_{18}H_{16}O_3$) foi baseada na dose-clínica diária de 600mg recomendada para humanos. Os cálculos foram feitos considerando-se uma pessoa adulta de 70kg; assim, as concentrações finais foram de $1,71mg.kg^{-1}$, $8,54mg.kg^{-1}$ e $42,85mg.kg^{-1}$, correspondentes, respectivamente, à 1/5, 1 e 5 vezes a dose clínica diária preconizada para humanos (BELCAVELLO et al., 2012).

A ipriflavona é uma substância lipofílica sem solubilidade desejável em água, $0,0009mg.mL$ a 37° (ROHATAGI, 1997) e por isso optou-se pela dissolução da droga em dimetilsulfóxido (DMSO), um solvente dipolar amplamente utilizado para solubilizar pequenas moléculas orgânicas (CAMICI et al., 2006).

3.2.3 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados 150 camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)*, 75 machos e 75 fêmeas, com idade entre 6 a 8 semanas e aproximadamente 30g m.c, selecionados aleatoriamente e fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos agrupados em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante, com ciclo claro-escuro de 12 h. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum*. Antes do início dos tratamentos, os camundongos foram aclimatados ao local de experimentação por uma semana.

Foram realizados três protocolos de antimutagenicidade (pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento) cada qual com seis grupos experimentais. Cada grupo experimental possuía 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) selecionados aleatoriamente e separados por sexo, como demonstrado na Tabela 1. As especificidades do tempo de tratamento e aplicação da CPA dos grupos experimentais, para cada protocolo realizado, serão detalhadas a seguir.

Tabela 1: Grupos experimentais, n=10/grupo:

Grupo	Sexo	n	Tratamento
NaCl 0,9%	M	5	Controle negativo (CN): Solução salina 0,9%; 0,005mL.g ⁻¹ m.c., vo.
	F	5	
DMSO	M	5	Controle do solvente da droga (CS): DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c., vo + CPA, v.i
	F	5	
Ciclofosfamida (50mg.kg ⁻¹ m.c.)	M	5	Controle positivo (CP): CPA 50mg.kg ⁻¹ m.c., v.i.
	F	5	
Ipriflavona (1,71mg.kg ⁻¹ m.c.)	M	5	Ipriflavona 1,71mg.kg ⁻¹ m.c., DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c., vo + CPA, v.i
	F	5	
Ipriflavona (8,57mg.kg ⁻¹ m.c.)	M	5	Ipriflavona 8,57mg.kg ⁻¹ m.c., DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c., vo + CPA, v.i
	F	5	
Ipriflavona (42,85mg.kg ⁻¹ m.c.)	M	5	Ipriflavona 42,85mg.kg ⁻¹ m.c., DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c., vo + CPA, v.i
	F	5	

F = Fêmeas; M = Machos; v.i = via intraperitoneal; vo = via oral; n = número de animais

3.2.4 Tratamentos

Os tratamentos foram realizados por via oral (gavage), uma vez que é a forma administrada clinicamente, com exceção da CPA, no qual a administração foi realizada por via intraperitoneal. A avaliação da ipriflavona como agente protetor e/ou reparador do material genético foi realizada utilizando-se os protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento, frente ao agente mutagênico CPA.

Nos protocolos experimentais houve a inclusão do controle do solvente, no qual os animais eram tratados com DMSO e ciclofosfamida, para avaliar se o DMSO exerce alguma influência nos parâmetros analisados. O volume administrado foi o mesmo utilizado para os tratamentos com ipriflavona (0,005mL.g⁻¹ m.c.).

Para os protocolos de tratamento simultâneo e pós-tratamento, foram realizados apenas um controle negativo e um controle do solvente da droga, e para os protocolos de tratamento simultâneo e pré-tratamento foi realizado apenas um controle positivo.

3.2.4.1 Pré-tratamento

O experimento seguindo o protocolo de pré-tratamento foi realizado segundo Ribeiro e colaboradores (2010) com algumas adaptações. Os camundongos foram tratados com a ipriflavona em suas respectivas concentrações (1,71; 8,54 e 42,85mg.kg⁻¹) uma vez ao dia, durante 14 dias. No 14º dia, após o tratamento por gavagem, foi administrado, via intraperitoneal, o agente mutagênico CPA (50mg.kg⁻¹ m.c.). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, 24 horas após a aplicação do agente mutagênico.

O grupo controle negativo (CN) foi tratado com solução salina (0,9%) durante 14 dias e a eutanásia foi realizada 24 horas após o último tratamento. O grupo controle solvente da droga (CS) também foi tratado durante 14 dias com o solvente DMSO (0,005mL.g⁻¹ m.c. vo.), seguido da aplicação da ciclofosfamida no 14º dia e da eutanásia 24 horas após o último tratamento, a fim de demonstrar se o solvente possui efeitos contra os danos causados pela CPA. Os animais do controle positivo (CP) receberam CPA (50mg.kg⁻¹ m.c., v.i) e foram eutanasiados 24 horas após sua administração.

Abaixo segue um esquema adaptado de Delmanto et al. (2001) de todo o pré-tratamento realizado:

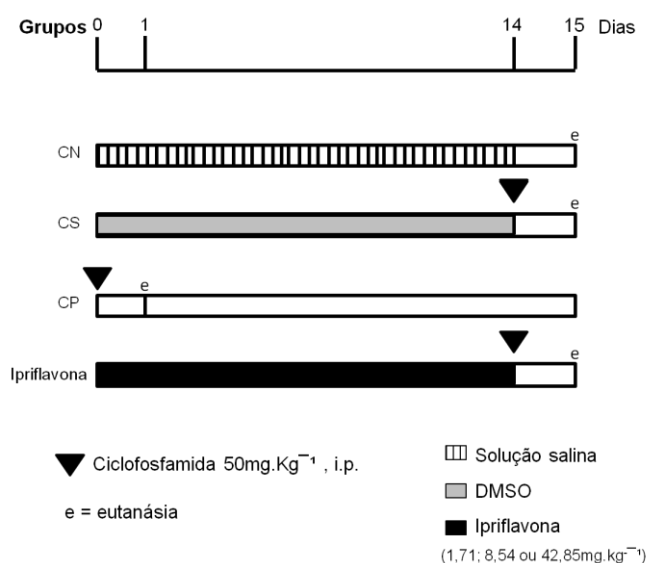


Figura 12: Esquema de exposição das drogas demonstrando o protocolo de pré-tratamento.

3.2.4.2 Tratamento simultâneo

Para a realização do experimento seguindo o protocolo de tratamento simultâneo, a ipriflavona, em suas respectivas concentrações, foi administrada em dose única, seguida da aplicação da CPA (50mg.kg^{-1} m.c., v.i). Vinte e quatro horas após a administração das drogas os animais foram eutanasiados (RIBEIRO et al., 2010).

O grupo CN foi tratado com uma dose única de solução salina (NaCl 0,9%) e a eutanásia foi realizada 24 horas após o tratamento. O grupo CS também foi tratado em dose única, seguido da aplicação da ciclofosfamida, a fim de demonstrar os efeitos do solvente na proteção e/ou reparo dos danos causados pelo agente clastogênico. O CP utilizado foi o mesmo que o utilizado no protocolo de pré-tratamento.

3.2.4.3 Pós-tratamento

Para a realização do experimento seguindo o protocolo de pós-tratamento, a CPA foi primeiramente administrada e 24 horas após sua aplicação os camundongos foram tratados com a ipriflavona em suas respectivas concentrações. A eutanásia foi realizada 24 horas após o tratamento com ipriflavona (48 horas após a aplicação da CPA). O grupo CN e o grupo CS utilizados foram os mesmos do tratamento simultâneo. O controle positivo foi realizado administrando-se o agente clastogênico CPA seguido da eutanásia 48 horas após a aplicação.

3.2.5 Preparação citológica e análise

A eutanásia dos animais foi feita por deslocamento cervical, com posterior retirada de ambos os fêmures de cada camundongo. As epífises distais foram cortadas e a

coleta da medula óssea de cada fêmur foi realizada com o auxílio de uma seringa previamente preenchida com 0.5mL soro bovino fetal. As amostras de medula foram coletadas em um tubo falcon, por meio de enxágue do interior do fêmur, logo após a eutanásia. Posterior a isso, o material de cada tubo, devidamente identificado, foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm, por duas vezes, descartando-se o sobrenadante. A confecção das lâminas foi realizada pelo método de esfregaço, sendo que para cada animal representante de seu grupo experimental foram confeccionadas 2 lâminas (APÊNDICE B).

Após a secagem do esfregaço, as lâminas foram fixadas em metanol por 10 minutos e coradas com Leishman, para a diferenciação das células sanguíneas, principalmente dos eritrócitos policromáticos (PCE), eritrócitos normocromáticos (NCE) e eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE), parâmetros das análises (APÊNDICE C).

As lâminas foram analisadas em teste cego, utilizando microscópio óptico com aumento de 1.000x. A antimutagenicidade da ipriflavona, frente aos danos causados pela CPA, foi avaliada através da análise de 2000 PCEs por animal (1000 por lâmina), anotando-se as frequências de MNPCEs. Sua ação protetora contra os efeitos citotóxicos da CPA foi avaliada pela razão de PCE no total de 400 eritrócitos (PCE + NCE), pela fórmula $PCE/(PCE+NCE)$. Toda a análise obedeceu aos critérios estabelecidos por Krishna e Hayashi (2000).

A porcentagem de redução de danos (diminuição da frequência média de MNPCE), nas diferentes concentrações e protocolos, foi calculada de acordo com Serpelone et al. (2008), usando a fórmula:

$$\% \text{ Redução} = \frac{\text{frequência de MNPCEs em A} - \text{frequência de MNPCEs em B}}{\text{frequência de MNPCEs em A} - \text{frequência de MNPCEs em C}} \times 100$$

onde “A” é o grupo de células tratadas com CPA; “B” é o grupo de células tratadas com ipriflavona e CPA; e “C” o grupo controle negativo (NaCl 0,9%).

Todos os dados foram tabulados segundo recomendações de Ribeiro (2003) com adaptações. A análise estatística foi realizada separando-se e combinando-se os

gêneros por meio de Análise de Variância (ANOVA) seguida teste *a posteriori* de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) para as diferenças estatísticas significativas. Para avaliar a normalidade dos resultados obtidos foi aplicado o teste de Kolmogorof-Smirnoff. A análise estatística para comparar as respostas aos tratamentos entre os sexos foi realizada aplicando-se o teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$). Todos os testes foram realizados com o auxílio do software Assistat 7.6 beta.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante da ipriflavona foram preparadas solução metanólica de DPPH 60 μ M e soluções metanólicas com a substância teste (ipriflavona) e com o padrão (rutina) em cinco concentrações diferentes: 500, 250, 150, 50 e 10 μ g.mL⁻¹. Todas as soluções foram deixadas em repouso durante 30 minutos, antes do início do experimento.

A solução de DPPH (60 μ M; 1mL) foi adicionada a solução teste (1mL) em suas respectivas concentrações, abrigadas da luz e em temperatura ambiente. Após 30 minutos, o valor da absorbância de cada amostra foi mensurado em espectrofotômetro UV/VIS a 517nm.

A atividade antioxidante da ipriflavona e do padrão rutina foi calculada através da porcentagem de inibição do DPPH, com a seguinte equação (NOIPA et al., 2011):

$$\% \text{ inibição do DPPH} = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$$

Onde:

Abs₀ = Absorbância do controle

Abs₁ = Absorbância da amostra

Foi utilizado como branco álcool metílico, para a calibração do espectrofotômetro. Solução de DPPH (60 μ M; 1mL) mais álcool metílico (1mL) foi utilizada como controle negativo. O experimento foi realizado em triplicata, para cada concentração testada.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIO DO MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS

As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam os efeitos da ipriflavona sobre a frequência de micronúcleos (MNPCE) induzidos pela ciclofosfamida (média $\pm$ erro padrão), a relação entre o número de eritrócitos policromáticos no total de eritrócitos (PCE/PCE+NCE) bem como a porcentagem de redução de danos, nos diferentes tratamentos e protocolos realizados, referentes ao ensaio de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. Os resultados serão apresentados separando-se e combinando-se os gêneros (M + F).

4.1.1 Pré-tratamento

A Tabela 2 sumariza os resultados obtidos no protocolo de pré-tratamento. Como observado, houve aumento estatisticamente significativo de MNPCEs após a exposição dos animais à CPA (50mg.kg^{-1} m.c., v.i) em comparação com o grupo CN, não exposto a droga. Além disso, a razão PCE/(PCE+NCE), nos camundongos tratados com CPA (CP), demonstrou o efeito citotóxico do mutágeno na proliferação celular da medula óssea, resultando em uma depressão significativa.

A análise estatística mostrou que todos os grupos (M + F) tratados com ipriflavona reduziram de forma significativa a frequência de MNPCEs em relação ao grupo CP tratado apenas com o mutágeno, indicando que a ipriflavona possui atividade antimutagênica nessas condições experimentais (Tabela 2). Houve também uma redução significativa na frequência de MNPCEs do grupo (M+F) tratado com o solvente da droga (DMSO), no entanto, de forma menos significativa do que os grupos tratados com a ipriflavona. As porcentagens de redução de danos dos grupos (M+F) tratados com a ipriflavona nas concentrações de 1,71; 8,57 e $42,85\text{mg.kg}^{-1}$ m.c, e do grupo CS foram de 85,7%; 71,66%; 73,67% e 16, 80%, respectivamente.

A mesma análise estatística, quando realizada separando-se os gêneros, demonstrou que o grupo de machos tratados com a menor concentração de ipriflavona ($1,71\text{mg.kg}^{-1}$ m.c) igualou estatisticamente a frequência de MNPCes com o grupo de machos do CN (NaCl 0,9%). Além disso, nos machos, o solvente DMSO não exerceu efeito na redução da frequência de MNPCes, mostrando-se estatisticamente igual ao CP.

As análises dos efeitos da ipriflavona e do DMSO sobre a citotoxicidade induzida pela CPA revelaram um aumento significativo da relação $\text{PCE}/(\text{PCE}+\text{NCE})$ em todos os grupos tratados (M + F). Este aumento também pôde ser observado nas análises com os grupos separados por gênero (Tabela 2).

Ao se comparar as respostas obtidas entre os gêneros, para cada tratamento realizado, observou-se que os machos apresentaram frequência de MNPCe estatisticamente maior que a das fêmeas apenas no tratamento com ipriflavona na concentração de $42,85\text{mg.kg}^{-1}$ m.c. não tendo sido observada diferença estatística na relação $\text{PCE}/(\text{PCE}+\text{NCE})$, quando comparados os dois sexos.

4.1.2 Tratamento Simultâneo

A Tabela 3 sumariza os resultados obtidos no protocolo de tratamento simultâneo. A análise estatística dos grupos (M + F) mostrou que a ipriflavona, em todas as concentrações testadas, bem como o DMSO, não apresentaram diferenças estatísticas significativas, quando comparados ao grupo CP, não reduzindo assim, a frequência de MNPCes.

No entanto, ao se comparar os tratamentos separados por gênero, a frequência de MNPCes no grupo de machos que recebeu ipriflavona na concentração de $8,57\text{mg.kg}^{-1}$ m.c foi estatisticamente menor do que no grupo de machos tratados com CPA (CP), sendo observada uma porcentagem de redução de danos de 29,01%. A porcentagem de redução de danos nos demais tratamentos foi baixa em todos os grupos experimentais, separados ou não por gênero, e até mesmo ausente no grupo de fêmeas tratadas com ipriflavona na concentração de $8,57\text{mg.kg}^{-1}$.

Tabela 2: Efeitos da administração da ipriflavona na frequência de MNPCE por 1000 células (média $\pm$ EP), na relação de PCE/(PCE+NCE) e a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de **pré-tratamento**.

Tratamentos	MNPCE (média $\pm$ EP)			PCE/(PCE+NCE) $\pm$ EP			Redução (%)		
	Macho	Fêmea	Grupo (M + F)	Macho	Fêmea	Grupo (M + F)	Macho	Fêmea	Grupo (M+F)
NaCl 0,9% ¹	4,75 $\pm$ 0,34 ^c	4,88 $\pm$ 0,39 ^d	4,82 $\pm$ 0,26 ^e	0,59 $\pm$ 0,014 ^a	0,62 $\pm$ 0,013 ^a	0,61 $\pm$ 0,010 ^a	-	-	-
DMSO ²	61,11 $\pm$ 2,81 ^a	50,87 $\pm$ 2,52 ^b	56,29 $\pm$ 2,27 ^b	0,48 $\pm$ 0,016 ^b	0,53 $\pm$ 0,022 ^b	0,50 $\pm$ 0,014 ^b	7,40	26,84	16,80
Ciclofosfamida ³ (50mg.kg ⁻¹ m.c.)	65,00 $\pm$ 2,06 ^a	68,85 $\pm$ 3,54 ^a	66,68 $\pm$ 1,99 ^a	0,41 $\pm$ 0,016 ^c	0,42 $\pm$ 0,019 ^c	0,41 $\pm$ 0,012 ^c	-	-	-
Ipriflavona (1,71mg.kg ⁻¹ m.c.)	12,22 $\pm$ 1,60 ^c	15,11 $\pm$ 2,31 ^c	13,66 $\pm$ 1,44 ^d	0,49 $\pm$ 0,016 ^b	0,51 $\pm$ 0,010 ^b	0,50 $\pm$ 0,010 ^b	87,72	83,73	85,70
Ipriflavona (8,57mg.kg ⁻¹ m.c.)	23 $\pm$ 2,01 ^b	21,42 $\pm$ 1,82 ^c	22,35 $\pm$ 1,38 ^c	0,56 $\pm$ 0,009 ^a	0,53 $\pm$ 0,017 ^{ab}	0,55 $\pm$ 0,009 ^b	70,02	73,68	71,66
Ipriflavona (42,85mg.kg ⁻¹ m.c.)	26,60 $\pm$ 2,12 ^{b*}	14,25 $\pm$ 1,41 ^{c*}	21,11 $\pm$ 1,97 ^c	0,54 $\pm$ 0,011 ^{ab}	0,52 $\pm$ 0,024 ^b	0,53 $\pm$ 0,013 ^b	64,10	85,10	73,67

Letras iguais representam semelhança estatística (ANOVA, Teste de Tukey, $P < 0,05$).

* Diferença estatística significativa entre os gêneros (Teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

¹ controle negativo; ² controle do solvente da droga; ³ controle positivo.

M: machos; F: fêmeas

EP = Erro Padrão

As análises dos efeitos da ipriflavona e do DMSO sobre a citotoxicidade induzida pela CPA (relação PCE/PCE+NCE) mostrou que todos os grupos (M + F) tratados com ipriflavona foram estatisticamente diferentes do grupo CP, enquanto o grupo tratado com DMSO foi estatisticamente igual (Teste de Tukey, $P < 0,05$). Os mesmos resultados foram obtidos quando comparados apenas os grupos de machos. Ao se analisar as fêmeas, pode-se observar que essa relação (PCE/PCE+NCE) no grupo de fêmeas tratadas com ipriflavona na dose de $8,57\text{mg.kg}^{-1}$ apresentou-se estatisticamente igual ao grupo tratado com CPA.

Ao se comparar as respostas obtidas entre os gêneros para cada tratamento, machos e fêmeas diferiram quanto a frequência de MNPCes apenas quando tratados com ipriflavona na concentração de $8,57\text{mg.kg}^{-1}$ m.c, e nas análises de citotoxicidade (PCE/PCE+NCE) os resultados entre machos e fêmeas diferiram no controle negativo, controle solvente e tratamento com ipriflavona ($1,71\text{mg.kg}^{-1}$ m.c).

O controle positivo, tratado com CPA, foi o mesmo utilizado no protocolo de pré tratamento.

4.1.3 Pós-tratamento

A Tabela 4 sumariza os resultados obtidos no protocolo de pós-tratamento. Como observado, a frequência de MNPCes do CP, tratado com CPA e sacrificado 48 horas após a aplicação do mutágeno, foi estatisticamente maior do que o grupo controle negativo. Além disso, a razão PCE/(PCE+NCE) demonstrou o efeito citotóxico da CPA na proliferação celular da medula óssea, resultando em uma depressão significativa.

Ao se analisar a frequência de MNPCes dos grupos (M + F) observa-se que todos os tratamentos, com exceção dos grupos tratados com DMSO e com ipriflavona ($8,57\text{mg.kg}^{-1}$ m.c), foram estatisticamente diferentes ao grupo tratado com CPA. O mesmo foi observado nas análises dos grupos de machos e de fêmeas, não sendo observada qualquer diferença estatística entre os gêneros, neste parâmetro

analisado. As porcentagens de redução de danos dos grupos (M + F) tratados com ipriflavona nas concentrações de 1,71; 8,57 e 42,85mg.kg⁻¹ m.c e do grupo tratado com DMSO foram de 70,64%; 10,64%; 32,30% e 2,59%, respectivamente.

As análises dos efeitos da ipriflavona e do DMSO sobre a citotoxicidade induzida pela CPA revelaram um aumento significativo da relação PCE/(PCE+NCE) em todos os grupos tratados, separados ou não por gênero, apresentando-se estatisticamente diferente ao CP, enquanto que o grupo tratado com DMSO não apresentou diferença. A comparação das análises obtidas entre os gêneros para cada grupo neste parâmetro analisado, demonstrou diferenças estatísticas entre os machos e fêmeas dos grupos controle negativo, controle solvente e no tratamento com ipriflavona na concentração de 42,85mg.kg⁻¹ m.c.

Tabela 3: Efeitos da administração da ipriflavona na frequência de MNPCE por 1000 células (média $\pm$ EP), na relação de PCE/(PCE+NCE) e a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de **tratamento simultâneo**.

Tratamentos	MNPCE (média $\pm$ EP)			PCE/(PCE+NCE) $\pm$ EP			Redução (%)		
	Macho	Fêmea	Grupo (M + F)	Macho	Fêmea	Grupo (M + F)	Macho	Fêmea	Grupo (M+F)
NaCl 0,9% ¹	3,40 $\pm$ 0,40 ^c	2,75 $\pm$ 0,67 ^c	3,11 $\pm$ 0,38 ^d	0,52 $\pm$ 0,017 ^{a*}	0,63 $\pm$ 0,017 ^{a*}	0,57 $\pm$ 0,018 ^a	-	-	-
DMSO ²	64,55 $\pm$ 2,85 ^a	57,37 $\pm$ 5,00 ^{ab}	61,17 $\pm$ 2,93 ^a	0,44 $\pm$ 0,009 ^{bc*}	0,40 $\pm$ 0,013 ^{e*}	0,42 $\pm$ 0,009 ^c	0,72	17,36	8,66
Ciclofosfamida ³ (50mg.kg ⁻¹ m.c.)	65,00 $\pm$ 2,06 ^a	68,85 $\pm$ 3,54 ^{ab}	66,68 $\pm$ 1,99 ^a	0,41 $\pm$ 0,016 ^c	0,42 $\pm$ 0,019 ^{de}	0,41 $\pm$ 0,012 ^c	-	-	-
Ipriflavona (1,71mg.kg ⁻¹ m.c.)	61,77 $\pm$ 2,99 ^a	55,87 $\pm$ 2,89 ^b	59 $\pm$ 2,20 ^a	0,49 $\pm$ 0,017 ^{ab*}	0,58 $\pm$ 0,023 ^{ab*}	0,54 $\pm$ 0,017 ^{ab}	5,23	19,63	12,09
Ipriflavona (8,57mg.kg ⁻¹ m.c.)	47,12 $\pm$ 2,83 ^{b*}	71,87 $\pm$ 2,69 ^{a*}	59,5 $\pm$ 4,41 ^a	0,51 $\pm$ 0,020 ^{ab}	0,50 $\pm$ 0,016 ^{cd}	0,50 $\pm$ 0,013 ^b	29,01	-	11,30
Ipriflavona (42,85mg.kg ⁻¹ m.c.)	61,28 $\pm$ 4,09 ^a	60,11 $\pm$ 3,50 ^{ab}	60,62 $\pm$ 2,58 ^a	0,51 $\pm$ 0,011 ^{ab}	0,53 $\pm$ 0,017 ^{bc}	0,52 $\pm$ 0,011 ^{ab}	6,02	13,23	9,53

Letras iguais representam semelhança estatística (ANOVA, Teste de Tukey, $P < 0,05$).

* Diferença estatística significativa entre os gêneros (Teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

¹ controle negativo; ² controle do solvente da droga; ³ controle positivo.

M: machos; F: fêmeas

EP = Erro Padrão

Tabela 4: Efeitos da administração da ipriflavona na frequência de MNPCE por 1000 células (média $\pm$ EP), na relação de PCE/(PCE+NCE) e, a porcentagem de redução dos danos induzidos pela ciclofosfamida, seguindo o protocolo de **pós-tratamento**.

Tratamentos	MNPCE (média $\pm$ EP)			PCE/(PCE+NCE) $\pm$ EP			Redução (%)		
	Macho	Fêmea	Grupo (M + F)	Macho	Fêmea	Grupo (M + F)	Macho	Fêmea	Grupo (M+F)
NaCl 0,9% ¹	3,40 $\pm$ 0,40 ^e	2,75 $\pm$ 0,67 ^d	3,11 $\pm$ 0,38 ^d	0,52 $\pm$ 0,017 ^{ab*}	0,63 $\pm$ 0,017 ^{a*}	0,57 $\pm$ 0,018 ^a	-	-	-
DMSO ²	64,55 $\pm$ 2,85 ^a	57,37 $\pm$ 5,00 ^{ab}	61,17 $\pm$ 2,93 ^a	0,44 $\pm$ 0,009 ^{bc*}	0,40 $\pm$ 0,013 ^{c*}	0,42 $\pm$ 0,009 ^{cd}	-	13,36	2,59
Ciclofosfamida ³ (50mg.kg ⁻¹ m.c.)	58,87 $\pm$ 2,60 ^{ab}	65,80 $\pm$ 2,39 ^a	62,72 $\pm$ 1,94 ^a	0,38 $\pm$ 0,014 ^c	0,38 $\pm$ 0,009 ^c	0,38 $\pm$ 0,008 ^d	-	-	-
Ipriflavona (1,71mg.kg ⁻¹ m.c.)	22,55 $\pm$ 1,30 ^d	18,66 $\pm$ 1,61 ^c	20,61 $\pm$ 1,13 ^c	0,48 $\pm$ 0,012 ^{ab}	0,47 $\pm$ 0,009 ^b	0,48 $\pm$ 0,008 ^{bc}	65,46	74,75	70,64
Ipriflavona (8,57mg.kg ⁻¹ m.c.)	51,75 $\pm$ 4,22 ^{bc}	61,00 $\pm$ 5,32 ^a	56,37 $\pm$ 3,59 ^a	0,51 $\pm$ 0,014 ^{ab}	0,49 $\pm$ 0,013 ^b	0,50 $\pm$ 0,010 ^b	12,84	7,61	10,64
Ipriflavona (42,85mg.kg ⁻¹ m.c.)	45,37 $\pm$ 3,89 ^c	41,28 $\pm$ 4,69 ^b	43,46 $\pm$ 3,06 ^b	0,55 $\pm$ 0,031 ^{a*}	0,65 $\pm$ 0,010 ^{a*}	0,60 $\pm$ 0,021 ^a	24,33	38,88	32,30

Letras iguais representam semelhança estatística (ANOVA, Teste de Tukey, $P < 0,05$).

* Diferença estatística significativa entre os gêneros (Teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

¹ controle negativo; ² controle do solvente da droga; ³ controle positivo.

M: machos; F: fêmeas

EP = Erro Padrão

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH

A análise dos resultados da atividade antioxidante da ipriflavona realizada pelo método fotolorimétrico do radical livre DPPH está representada na Figura 13. Como observado, os valores referentes à atividade antioxidante da ipriflavona, em todas as concentrações testadas, foram muito menores (0,82% a 1,51%) do que os do padrão rutina (91,71% a 93,75%).

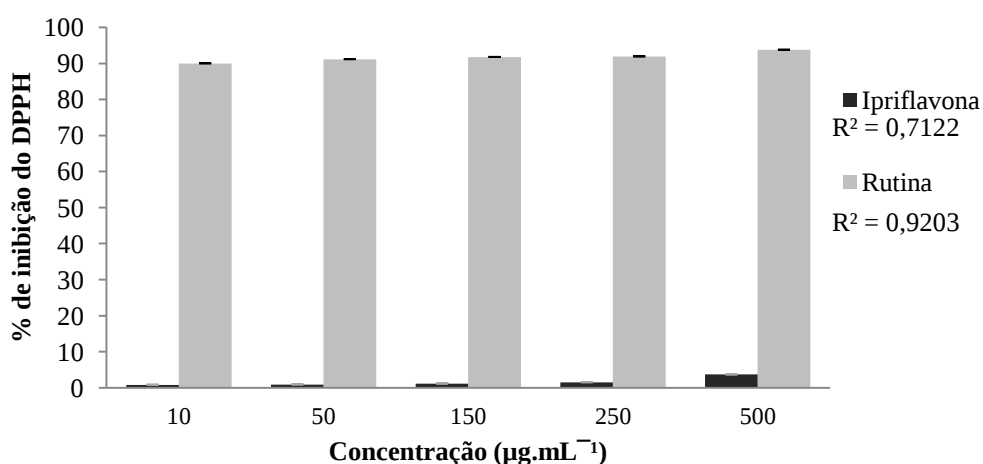


Figura 13: Atividade antioxidante da ipriflavona e do padrão rutina demonstrada pela porcentagem de inibição do DPPH.

5 DISCUSSÃO

Uma boa estratégia para prevenir as doenças decorrentes das mutações é a ingestão de substâncias, sejam elas naturais ou sintéticas, capazes de impedir a formação ou de reparar um dano já constituído. Tem sido demonstrado que a absorção de substâncias químicas pode modular a genotoxicidade de drogas mutagênicas e, portanto, podem reduzir as chances de desenvolver um tumor (AYDEMIR et al., 2005).

Dentre essas substâncias, podemos encontrar vários metabólitos secundários de organismos vegetais, tais como, flavonóides, alcalóides, terpenos, cumarinas dentre outros. Diversos estudos demonstram o sucesso dos flavonóides na redução de danos cromossômicos induzidos por agentes físicos ou químicos reconhecidamente citotóxicos e mutagênicos. Algumas pesquisas realizadas com a hesperidina, naringina e curcumina demonstram, como na presente pesquisa, a atividade antimutagênica contra os danos genotóxicos induzidos por agentes químicos, incluindo agentes alquilantes, por meio de pré-tratamento em células de medula óssea de camundongos *in vivo* e em testes *in vitro* (ANTUNES et al., 2000; ATTIA, 2008; AHMADI et al., 2008; POLÍVKOVÁ et al., 2006).

De fato, muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de avaliar as propriedades toxicológicas dos flavonóides, sendo que grande parte delas focalizam na avaliação dos seus efeitos protetores nos danos induzidos ao material genético, uma vez que os flavonóides possuem muitas propriedades benéficas já conhecidas (IMHOF et al., 2008; KURZAWA-ZEGOTA et al., 2012; MIN; EBELER, 2008; WILLIAMS et al., 2004).

Com relação às isoflavonas, Plewa et al. (2001) e Miyazawa et al. (1999) relataram que a isoflavona daidzeína (precursora da ipriflavona e um de seus metabólitos), possui atividade antígeno-tóxica, *in vitro*, contra mutágenos químicos, utilizando células de ovário de hamster Chinês e células de *Salmonella typhimurium* TA1535/Psk1002. Snyder e Gillies (2002) também em pesquisas realizadas com a daidzeína demonstraram sua eficácia na redução da clastogenicidade induzida pela genisteína em células V79 de hamster chinês. Além disso, muitos estudos de antimutagenicidade realizados com a soja *in vivo* e *in vitro* atribuem seu efeito protetor ao teor de isoflavonas, principalmente a daidzeína e a genisteína (AZEVEDO et al., 2010; LIU et al., 2005; RÜFER; KULLING, 2006).

Algumas pesquisas demonstraram ainda a atividade antimutagênica de compostos sintéticos, dentre eles a todralazina (um medicamento anti-hipertensivo) e flufenazina (uma droga psicotrópica) (GASIOROWSKI et al. 2000, 2001a). Entretanto, até o momento, nenhum teste de antimutagenicidade foi realizado com isoflavonas sintéticas.

Assim, esse trabalho propôs avaliar os efeitos da ipriflavona (isoflavona sintética), sobre a mutagenicidade e citotoxicidade induzidas pelo agente antineoplásico ciclofosfamida, pelo ensaio do micronúcleo em eritrócitos de medula óssea de camundongos *in vivo*. Este bioensaio foi o escolhido, uma vez que a ipriflavona passa por um longo processo de metabolização hepática que resulta em sete metabólitos distintos (M1-M7), o que seria dificilmente alcançado em sistemas teste *in vitro*.

Como já esperado, em todos os protocolos experimentais realizados, o tratamento com o quimioterápico ciclofosfamida aumentou significativamente a frequência de MNPCs e causou a depressão da razão $PCE/(PCE+NCE)$, indicando mutagenicidade e citotoxicidade, respectivamente, corroborando com os dados da literatura (SELVAKUMAR et al., 2006; VALADARES et al., 2007). Uma das prováveis causas para esses efeitos é a de que os metabólitos da CPA podem ligar-se ao DNA causando danos que podem resultar em quebras cromossômicas, formação de micronúcleos e morte celular (MURATA et al., 2004).

Ao pesquisar a cinética de formação de micronúcleos por agentes alquilantes bifuncionais em PCEs, Morales-Ramírez et al. (2004) observaram que a indução de danos ocorre na primeira divisão celular, devido ao reparo equivocado de lesões primárias. Segundo os pesquisadores, a maior frequência de MNPCs ocorre entre 24-35 horas, para os diferentes agentes antitumorais nas diferentes concentrações pesquisados, o que pode justificar a menor frequência de MNPCs observada 48 horas após a exposição dos animais à CPA, situação também relatada nos estudos de Primo et al. (2010).

O grupo solvente da droga (DMSO) não influenciou nos parâmetros analisados nos protocolos de tratamento simultâneo e pós-tratamento, igualando-se estatisticamente ao CP, que foi tratado apenas com o mutágeno, o que evidencia não exercer qualquer tipo de influência na mutagenicidade e citotoxicidade induzidas pela CPA, nessas condições experimentais.

Entretanto, quando realizado o protocolo de pré-tratamento, em que os camundongos receberam o solvente durante 14 dias seguido da aplicação da CPA no 14º dia, o DMSO revelou-se um agente protetor, diminuindo a frequência de

MNPCE e a citotoxicidade induzidas pelo mutágeno, reduzindo os danos em 16,80%. No entanto, essa redução foi menos significativa do que nos tratamentos realizados com ipriflavona, seguindo o mesmo protocolo.

O DMSO tem sido reportado por possuir atividade antioxidante não-enzimática em sistema teste *in vivo*, através do sequestro de radicais livres, principalmente os radicais hidroxil (ALMEIDA et al., 2004; MOHANRAJ et al., 1998; VELASCO et al., 2003), além de ser altamente permeável em membranas, o que facilita o transporte de alguns fármacos para o interior da célula (EVANS et al., 1993), otimizando a atuação de drogas intracelularmente.

Como a ação de drogas quimioterápicas pode ser mediada pelo acúmulo intracelular de radicais livres de oxigênio (FAINTUCH et al., 1995, apud GARÓFOLO, 2003), o DMSO pode ter atuado na neutralização de parte desses radicais, reduzindo-se assim a frequência de danos visíveis no material genético (MNPCE).

Os resultados obtidos nesta pesquisa, por meio do protocolo de tratamento simultâneo (Tabela 3), de modo geral, demonstraram a ausência de atividade antimutagênica da ipriflavona nas três concentrações testadas. Essa ausência de qualquer efeito contra os danos induzidos pelo mutágeno pode estar relacionada ao rápido metabolismo da droga no organismo e ao extenso efeito de primeira passagem que sofre no fígado.

Muitos estudos de farmacocinética demonstram que a ipriflavona é prontamente absorvida no intestino e rapidamente metabolizada em dois metabólitos, o M1 e M5, atingindo seu nível sérico máximo em ratos, no máximo, em 90 minutos (KIM; LEE, 2002; LEE et al., 2009; YOSHIDA et al., 1985; YUN et al., 2012). No entanto, a biodisponibilidade desses compostos é baixa e o tempo de meia-vida curto. Segundo Lee et al. (2009), antes mesmo de completar 24 horas de sua ingestão a ipriflavona já não é detectável no plasma sanguíneo. A mesma análise farmacocinética, realizada por Yun et al. (2012), com outra técnica, demonstrou que a ipriflavona é detectável por até 72 horas, no entanto, com um decaimento progressivo da concentração nas primeiras horas, sendo este um dos fatores que justificaria sua ineficácia na diminuição dos danos causados pela CPA, quando

administrada em dose única, nas condições experimentais do tratamento simultâneo.

Além disso, a ipriflavona é uma droga que possui extenso efeito de primeira passagem, em que sua concentração é significativamente reduzida no fígado antes mesmo de atingir a circulação sistêmica (KIM et al., 2000). Segundo Kim e Lee (2002), aproximadamente 64% da droga administrada oralmente são perdidos por ações gastrointestinais, como a absorção incompleta e/ou efeitos de primeira passagem intestinal e hepático. Isto diminui significativamente a biodisponibilidade da droga no plasma e, conseqüentemente, sua eficácia terapêutica (YUN et al., 2012), quando administrada em dose única.

No presente estudo, apesar de a ipriflavona não diminuir a frequência de MNPC, quando utilizada simultaneamente com o mutágeno, ela foi eficaz na redução da citotoxicidade induzida pela CPA, expressa pelo aumento da relação PCE/PCE+NCE (Tabela 3). Vale ressaltar ainda, que o aumento dessa razão foi observado em todos os protocolos realizados (Tabela 2, 3 e 4) reforçando, com isso, a ação da ipriflavona em contra à citotoxicidade, nessas condições experimentais.

Quando o processo de eritropoiese das células da medula óssea é afetado por um agente citotóxico, é observada a redução na porcentagem de PCE no total de eritrócitos. Essa redução sugere a ocorrência da morte de células jovens ou a depressão da proliferação na medula devido a alterações na divisão celular ou a apoptose antes da maturação (RIBEIRO, 2003). Ao utilizar um agente quimioprotetor juntamente com o agente antineoplásico citotóxico, espera-se um aumento da razão PCE/(PCE+NCE), em comparação ao grupo que foi exposto apenas ao agente antineoplásico, fato este observado nesse estudo.

Os resultados obtidos por meio do protocolo de pós-tratamento (Tabela 4) são indicativos de que a ipriflavona pode atuar como um agente promotor do sistema de reparo, estimulando enzimas reparadoras de mutações, tais como a topoisomerase II e como um agente bloqueador da fixação de danos no DNA, agindo como um agente bioantimutagênico (KADA et al., 1982, apud SUGUI, 2006).

Segundo Glen e Dubrova (2012), o genoma de camundongos tratados com CPA desestabiliza-se de forma que novas mutações surgem muito tempo depois de

encerrada sua exposição à droga, e como se trata de um tratamento feito sistematicamente, muitos tecidos poderiam ser afetados. Dessa forma, a ipriflavona poderia ser promissora na redução do aparecimento dessas mutações “tardias” decorrentes do processo quimioterápico, quando administrada posterior a esse tratamento.

O fato de as ações da ipriflavona observadas no presente protocolo (pós-tratamento) não se apresentarem de maneira dose-dependente é corroborado por outros estudos que demonstram que a biodisponibilidade e a farmacocinética da ipriflavona são dose-independentes (KIM; LEE, 2002; ROHATAGI et al., 1997).

Tem sido reportado que a ipriflavona e a ciclofosfamida são drogas metabolizadas principalmente via isoenzimas hepáticas do citocromo P-450 (CYP). Estão envolvidas no metabolismo da ipriflavona as CYP3A4, 1A1, 1A2, 2C9 e 2C11 (CHUNG et al., 2006, CHUNG et al., 2008; LEE et al., 2009; MONOSTORY et al., 1998; MOON et al., 2007), enquanto que as CYP2A6, 2B6, 3A4, 3A5, 2C8, 2C9, 2C19 estão envolvidas na biotransformação do pró-fármaco ciclofosfamida em seus metabólitos ativos 4-hidroxi-ciclofosfamida e aldofosfamida (Figura 7) (SHUKLA et al., 2001). Deste modo, ambas as drogas possuem ação dependente da taxa de metabolização hepática.

As enzimas do citocromo P-450 desempenham um importante papel na biotransformação de drogas lipofílicas para compostos mais polares. Os metabólitos resultantes da biotransformação podem ser inativos, menos ativos ou ainda demonstrar aumento da atividade farmacológica, quando comparados ao composto original. Neste sentido, a atividade das CYPs pode determinar a resposta do paciente a uma determinada droga, de modo que qualquer alteração na atividade das isoformas pode influenciar na taxa de ativação ou inativação da droga (HAYATSU et al., 1988; MONOSTORY et al., 1998; MONOSTORY; VERECZKEY, 1996a).

Várias pesquisas têm indicado que a ipriflavona, bem como seus metabólitos, possui efeitos inibitórios sobre as CYPs 1A2, 2C8, 2C9, 2C19 e as da família 3A, em especial a CYP3A4 (ANDERSON; SCOGGINS, 2007, apud YUN et al., 2012;

CHUNG et al., 2006; MONOSTORY et al., 1998; MOON et al., 2007; ROHATAGI et al., 1997), muitas delas envolvidas na biotransformação da CPA.

Desse modo, a eficácia do protocolo de pré-tratamento (Tabela 2), em que os grupos foram tratados com ipriflavona durante 14 dias seguidos da aplicação da CPA no 14º dia, pode estar relacionada à capacidade da ipriflavona de inibir enzimas fundamentais no processo de biotransformação do pró-fármaco CPA, reduzindo, de forma significativa, a formação de seus metabólitos citotóxicos e mutagênicos.

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a ipriflavona, de fato, pode causar possíveis interações droga-droga por interferência no metabolismo (YUN et al., 2012). Pesquisas realizadas por Monostory et al. (1998) e Monostory e Vereczkey (1995, 1996a,b), por exemplo, demonstraram que a utilização da ipriflavona exerce efeito inibitório no metabolismo de teofilina, um medicamento utilizado por pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, com conseqüente aumento dos níveis séricos de teofilina não-metabolizada devido à interação competitiva e inibitória que a ipriflavona e/ou seus metabólitos exercem sobre algumas isoenzimas do citocromo P-450 que mediam o metabolismo desse fármaco, em especial a CYP1A2.

A ipriflavona também tem sido demonstrada interagindo com a warfarina (Coumadin), um fármaco anticoagulante utilizado na prevenção e/ou tratamento da trombose, devido à sua atuação inibindo competitivamente a isoenzima CYP2C9, responsável pela catalisação da warfarina (ANDERSON; SCOGGINS, 2007, apud YUN et al., 2012; SCOTT; ELMER, 2002). Monostory et al. (1998) reportam que o metabólito M1 da ipriflavona é capaz de inibir cerca de 50% da atividade desta CYP.

Sladek (1972) demonstrou ainda que a taxa de ativação da ciclofosfamida pode ser estimulada ou inibida por meio de pré-tratamento com diversas drogas envolvidas na estimulação e inibição das CYPs. O pré-tratamento com fenobarbital, um indutor bem conhecido dessas isoenzimas, causou um aumento acentuado nos níveis da atividade alquilante, após a administração da CPA, ao passo que o pré-tratamento com proadifen (SKF 525A), um inibidor comumente utilizado, inibiu a conversão da CPA *in vivo* para os seus metabólitos alquilantes e citotóxicos, sem alterar sua resposta terapêutica. Todos os inibidores das CYPs hepáticas testados por este pesquisador reduziram a letalidade da ciclofosfamida em ratos e camundongos. Te et

al. (1997) demonstraram, como no presente trabalho, que a clorofilina foi capaz de reduzir a mutagenicidade da ciclofosfamida, em teste de micronúcleo em medula óssea, sugerindo que o mecanismo pelo qual a clorofilina previne a mutagenicidade desse antineoplásico, seja por interferência em sua ativação metabólica.

Tais estudos poderiam auxiliar no entendimento ou mesmo justificar os resultados promissores da ipriflavona observados no protocolo de pré-tratamento, uma vez que reconhecidamente é uma droga inibidora de muitas isoenzimas necessárias para a biotransformação deste antineoplásico e de muitos outros xenobióticos, sendo então susceptível de ter um papel protetor contra a indução de danos celulares pela ativação de carcinógenos (REN et al., 2003).

Assim, de modo geral, todo o fármaco que necessite de alguma das isoenzimas inibidas em decorrência da utilização da ipriflavona poderá ter a biotransformação reduzida ou até mesmo ausente (MONOSTORY et al., 1998; OSHIMA-FRANCO; FRANCO, 2003). Além disso, a existência da competição entre substratos metabolizados pelas mesmas CYPs poderia acarretar a inibição das mesmas, neste caso, competitiva (OSHIMA-FRANCO; FRANCO, 2003). Dessa forma, a possível interação existente entre ipriflavona e ciclofosfamida, caso ocorra em nível de CYPs, poderia ser por ambos mecanismos, devido à inibição de isoenzimas fundamentais na metabolização da CPA pela ipriflavona (CYP2C9, 2C19, 3A5/4), como também por inibição competitiva, já que as duas drogas necessitam das CYP3A4 e CYP2C9 para serem metabolizadas.

A interferência no metabolismo de xenobióticos P-450-dependentes parece ser o mecanismo mais seletivo pelo qual fármacos ou componentes da dieta exercem seus efeitos sobre o metabolismo de drogas e a carcinogênese (YANG et al., 1992). Portanto, as propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas de algumas substâncias têm sido associadas a inibidores e estimuladores das enzimas do citocromo P-450 (FERGUSON, 1994).

No entanto, são necessários estudos futuros para avaliar se a ipriflavona de fato interage com a ciclofosfamida no nível das CYPs hepáticas de forma a reduzir o seu metabolismo e consequentemente sua atividade mutagênica e citotóxica, e se essa atividade protetora não afeta sua eficácia terapêutica no tratamento de neoplasias.

A resposta diferenciada entre os gêneros observada em alguns tratamentos nos três protocolos realizados (Tabela 2, 3 e 4) e a variedade interindividual dentro de um mesmo tratamento já eram esperados devido à taxa de metabolismo variável entre os indivíduos e as diferenças hormonais entre os sexos (HAYES et al., 2009; MOON et al., 2007). A variabilidade interindividual na expressão da CYP3A4 e CYP1A2, bem como polimorfismos na CYP2C9 podem afetar de forma significativa o metabolismo da ipriflavona (YUN et al., 2012). Tais variações observadas podem ser também resultantes das diferenças na absorção da droga, que poderiam ser minimizadas com sua administração intravenosa (KIM; LEE, 2002). Estudos realizados por Yun et al. (2012) demonstraram que as concentrações de ipriflavona e seus metabólitos no plasma sanguíneo realmente variam interindividualmente, o que pode resultar em diferentes respostas terapêuticas.

De modo geral, a dose menor ($1,71\text{mg.kg}^{-1}$ m.c.) foi a que demonstrou maior eficácia na redução da frequência de MNPCs, considerando-se os protocolos de pré- e pós-tratamento.

Pesquisas realizadas por Rohatagi et al. (1997) demonstram que a formação dos metabólitos da ipriflavona diminui com o aumento da dose (exceto para M1 e M5), possivelmente devido à auto-inibição de seu metabolismo, uma vez que essa droga é uma potente inibidora da CYP3A4 e seu metabolismo pode ser parcialmente mediado por essa CYP. Kim e Lee (2002) reportam ainda que o metabolismo da ipriflavona pode ser saturado quando a ipriflavona é administrada em doses maiores (20 e 40mg.kg^{-1} m.c. via intravenosa), ao observar o acúmulo de metabólitos M5 na urina, sugerindo que o metabolismo de M5 para as formas M6 e M7 (Figura 4) poderia estar saturado, fato este que não foi observado pelos pesquisadores quando a ipriflavona foi administrada em baixas doses (5 e 10mg.kg^{-1} m.c.).

A ciclofosfamida, além de exercer a sua função terapêutica via alquilação é um quimioterápico que gera radicais livres (EL-BAYOUMY, 2001) e induz o decaimento nos níveis de antioxidantes enzimáticos com consequente aumento nos níveis de produtos de peroxidação lipídica (hidroperóxidos e malondialdeído - MDA) (MANDA; BHATIA, 2003), sugerindo que os danos visíveis no material genético podem ser resultantes do estresse oxidativo induzido por este antineoplásico (SUGUMAR et al., 2007, apud FILHO et al., 2011).

Há uma relação direta das espécies reativas com a mutagênese, de modo que compostos antioxidantes, naturais ou sintéticos, podem prevenir os efeitos genéticos de mutágenos e carcinógenos de forma eficiente (KHOURI et al., 2007). Uma gama de compostos antimutagênicos possuem também a capacidade de neutralizar radicais livres (FERGUSON, 1994) e com a finalidade de avaliar se a ipriflavona atua por meio desse mecanismo, foi realizado o teste fotolorimétrico utilizando o radical livre DPPH.

Os resultados não satisfatórios obtidos no teste de DPPH demonstraram a incapacidade da ipriflavona de doar átomos de hidrogênio. Todavia, a quantidade reduzida de ipriflavona inalterada que é encontrada presente no plasma e na urina e a presença em concentrações elevadas de alguns de seus metabólitos, sugere que os compostos resultantes do seu metabolismo podem apresentar efeitos biológicos diferentes da sua molécula original, não metabolizada (ARORA et al., 1998; RONDELLI, et al., 1991). Essa diferença pôde ser observada em estudos de mutagenicidade realizados por Belcavello et al. (2012), em que a ipriflavona em sistema-teste *in vitro* apresentou citotoxicidade e mutagenicidade e em sistema-teste *in vivo*, com a metabolização hepática presente, não apresentou tais efeitos. Assim, estudos complementares são necessários para avaliar a ação de seus metabólitos em um mesmo sistema teste, para que conclusões sejam obtidas.

Nossos resultados corroboram com os dados da literatura demonstrando que o DPPH não reage com flavonóides que não contenham nenhum grupo hidroxila (OH) no anel B (Figura 1) (YOKOZAMA et al., 1998, apud ROGINSKY; LISSI, 2005), como é o caso da ipriflavona. No entanto, os metabólitos da ipriflavona, em especial o M2 (daidzeína), M3, M6 e M7, possuem estrutura química potencialmente doadora de átomos de hidrogênio, embora nenhum de seus metabólitos apresente todos os requisitos necessários para ser um potente agente antioxidante por esse mecanismo (SILVA, 2011).

Além disso, a ipriflavona e seus metabólitos possuem potencial para agir por meio de outros mecanismos que não seja o de doar hidrogênios. Arora et al. (1998) demonstraram que a daidzeína, um dos metabólitos da ipriflavona (M2), reduz o índice de peroxidação lipídica induzida por íons metálicos (Fe II e Fe III), sugerindo

que essa isoflavona pode ter sua atividade antioxidante relacionada à capacidade de quelar metais.

Vários fatores estão associados ao aumento do estresse oxidativo em pacientes com câncer e que fazem a utilização de quimioterápicos; dentre eles estão incluídos os distúrbios nos estoques de ferro, com a liberação desses íons (Fe II e III) durante a quimioterapia, devido à inibição do retículo endoplasmático das células que, normalmente, captam o ferro liberado pela lise das hemácias (GARÓFOLO, 2003).

Follézou e Bizon (1986) citados por Garófolo (2003) demonstraram que a ciclofosfamida é uma das drogas quimioterápicas que provocam maior elevação do ferro sérico e que este íon é potencialmente nocivo, uma vez que é o principal catalisador das reações de radicais livres *in vivo*. Assim, o ferro livre pode atuar como potente oxidante, aumentando a produção de espécies reativas. Naim et al. (1976) demonstraram ainda que as isoflavonas, como a daidzeína, podem atuar evitando a hemólise de eritrócitos em coelho, o que diminuiria ainda mais a quantidade de íons ferro livres. Dessa forma, a ipriflavona e seus metabólitos podem estar atuando como agente quelante desses íons metálicos potencialmente nocivos, de forma a evitar a formação de espécies reativas decorrentes da utilização do antineoplásico, reduzindo-se assim os danos no DNA.

Desse modo, visto que as isoflavonas são indicadas como bons agentes antioxidantes, são necessários estudos complementares para avaliar esse potencial na ipriflavona e seus metabólitos, por meio de novos testes *in vitro* e *in vivo*. Além disso, estudos futuros são necessários com vistas à avaliação dos seus potenciais antimutagênicos em outros sistemas testes, para que assim seu mecanismo de ação possa ser elucidado.

Deve-se ainda atentar para a possível interação da ipriflavona com a CPA, uma vez que a inibição de enzimas metabolizadoras como um efeito colateral da terapia medicamentosa é de grande interesse clínico, pois pode causar efeitos colaterais tóxicos inesperados ou a falta de ativação metabólica de um pró-fármaco, levando à perda dos seus efeitos farmacológicos (MONOSTORY et al., 1998).

Nossos resultados sugerem que podem existir várias maneiras através das quais a ipriflavona pode afetar os efeitos da CPA, por meio de mecanismos de

desmutagênese, impedindo a constituição dos danos (pré-tratamento), e de bioantimutagênese, atuando como moduladora no reparo dos danos (pós-tratamento).

Se os resultados aqui obtidos forem reforçados em outros sistemas testes, no futuro, a ipriflavona poderá ser indicada como um agente quimiopreventivo a ser usado na redução da ocorrência de cânceres ou mesmo como um coadjuvante do tratamento quimioterápico.

6. CONCLUSÕES

Considerando o objetivo de avaliar a atividade da ipriflavona contra os danos e a citotoxicidade induzidos pelo agente antineoplásico ciclofosfamida sobre os eritrócitos de medula óssea de camundongos *in vivo*, os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- Em todas as concentrações testadas e em todos os protocolos realizados a ipriflavona reduziu a citotoxicidade induzida pela ciclofosfamida.
- Todas as concentrações de ipriflavona testadas (1,71; 8,57 e 42,85mg.kg⁻¹), quando administradas simultaneamente com o mutágeno (protocolo de tratamento simultâneo), não reduziram de forma significativa a frequência MNPCes, não apresentando efeito antimutagênico nesta condição.
- Todas as concentrações de ipriflavona testadas (1,71; 8,57 e 42,85mg.kg⁻¹), quando administradas durante 14 dias antes da aplicação do mutágeno (protocolo de pré-tratamento), demonstraram-se eficazes na redução da frequência de MNPCes, apresentando-se como um potente agente antimutagênico (quimiopreventivo) contra os danos induzidos pelo mutágeno, nessas condições experimentais.
- As concentrações de 1,71e 42,85mg.kg⁻¹ foram as que se demonstraram eficazes, quando a ipriflavona foi administrada 24 horas após a administração do mutágeno (protocolo de pós-tratamento), reduzindo de forma significativa a frequência de MNPCes, enquanto a concentração de 8,57mg.kg⁻¹, neste mesmo protocolo, não apresentou efeito antimutagênico.
- A ipriflavona não-metabolizada não apresenta a capacidade de doar hidrogênios para o radical livre DPPH, não apresentando atividade antioxidante nesse sistema teste.

- De modo geral, os machos e as fêmeas responderam aos tratamentos de forma semelhante, diferindo estatisticamente entre si quanto às análises de antimutagenicidade apenas nas concentrações de $8,57 \text{ mg.kg}^{-1}$ e $42,85 \text{ mg.kg}^{-1}$ quando da realização dos protocolos de tratamento simultâneo e pré-tratamento, respectivamente.
- Quanto à citotoxicidade, os resultados de machos e fêmeas diferiram nos controles negativo e solvente, quando realizados os protocolos de tratamento simultâneo e pós-tratamento e, também, nas concentrações de $1,71 \text{ mg.kg}^{-1}$, no tratamentos simultâneo e de $42,85 \text{ mg.kg}^{-1}$, no pós-tratamento.
- O protocolo de pré-tratamento foi o que apresentou maiores porcentagens de redução nas três concentrações testadas, seguido do protocolo de pós-tratamento.
- A atividade antimutagênica é dose independente e, possivelmente, o mecanismo de ação da ipriflavona, para proteger ou reparar os danos induzidos pela ciclofosfamida, é por redução do metabolismo desse quimioterápico.
- São necessários estudos futuros para melhor elucidar os mecanismos de ação da droga e validar sua utilização como medicamento para a prevenção das injúrias causadas pela ciclofosfamida no material genético.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMI, S. et al. Ipriflavone prevents radial bone loss in postmenopausal women with low bone mass over 2 years. **Osteoporosys Int.**, v. 7, n. 2, p. 119-125, 1997.
- AGNUSDEI, D.; BUFALINO, L. Efficacy of ipriflavone in established osteoporosis and long-term safety. **Calcif. Tissue Int.**, v. 61, p. 23-27, 1997.
- AGNUSDEI, D. et al. Metabolic and clinical effects of ipriflavone in established postmenopausal osteoporosis. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v. 15, n. 2, p. 97-104, 1989.
- AGNUSDEI, D. et al. Effects of ipriflavone on bone mass and calcium metabolism in postmenopausal osteoporosis. **Bone and Miner.**, v. 19, p. 43-48, 1992a.
- AGNUSDEI, D. et al. Short treatment of Paget's disease of bone with ipriflavona. **Bone Miner.**, v. 19, p. 35-42, 1992b.
- AGNUSDEI, D. et al. A double blind, placebo-controlled trial of ipriflavone for prevention of postmenopausal spinal bone loss. **Calcif. Tissue Int.**, v. 61, n. 2, p. 142-147, 1997.
- AHMADI, A. et al. Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, n. 6, p. 794-797, 2008.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWS, J. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004. 1549 p.
- ALDRIGHI, J.M.; ALDRIGHI, C.M.S.; ALDRIGHI, A.P.S. Alterações sistêmicas no climatério. **Rev. Bras. Med.**, v. 59, p. 15-21, 2002.
- ALEXANDERSEN, P. et al. Ipriflavone in the treatment of postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 285, n. 11, p. 1482-1488, 2001.
- ALLISON, D.B. et al. A novel soy-based meal replacement formula for weight loss among obese individuals: a randomized controlled clinical trial. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. 514-522, 2003.
- ALMEIDA, K. G. et al. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 6, 2004.
- ALMEIDA V.L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova.**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANDERSON, G.L. et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v. 291, n. 14, p. 1701-1712, 2004.

ANTUNES, L.M.G.; ARAUJO, M.C.P. Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. **Rev. de Nutr.**, v. 13, n. 2, p. 81-88, 2000.

ANTUNES, L.M.G. et al. Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. **Mutat. Res.**, v. 465, p. 131-137, 2000.

ARJMANDI, B.H., KHALIL, D.A., HOLLIS, B.W. Ipriflavone, a synthetic phytoestrogen, enhances intestinal calcium transport *in vitro*. **Calcif. Tissue Int.**, v. 67, n. 3, p. 225-229, 2000.

ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 356, n. 2, p. 133-141, 1998.

ATTIA, S.M. Abatement by naringin of lomefloxacin-induced genomic instability in mice. **Mutagenesis**, v. 23, n. 6, p. 515-521, 2008.

AZEVEDO, L.A.J.C. et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1671-1676, 2003.

AZEVEDO, L. et al. *In vivo* antimutagenic properties of transgenic and conventional soybeans. **J. Med. Food.**, v. 13, n. 6, p. 1402-1408, 2010.

AYDEMIR, N.; CELIKLER, S.; BILALOGLU, R. *In vitro* genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 582, p. 35-41, 2005.

BANDEIRA, F. et al. Paget's disease of bone Characteristics of 49 patients from a single institution in Recife, PE, Brazil. **J. Bone Miner. Res.**, v.30, p.1055-1061, 2010.

BARNES, S. Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. **J. Nutr.** v. 125, n. 3, p. 777-783, 1995.

BEG, T. et al. Antimutagenic evaluation of genistein, a polyphenol, in cultured human peripheral blood lymphocytes. **Biomed. Res.**, v. 18, n. 2, p. 139-143, 2007.

BELCAVELLO, L. et al. Mutagenicity of ipriflavone *in vivo* and *in vitro*. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 50, p. 996-1000, 2012.

BENVENUTI, S. et al. Effects of ipriflavone and its metabolites on a clonal osteoblastic cell line. **J. Bone Miner. Res.**, v. 6, n. 9, p. 987-996, 1991.

BERHOW, M.A. et al. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. **Mutat. Res.**, v. 448, n. 1, p. 11-22, 2000.

BHATHENA, S.J; VELASQUEZ, M.T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. **Am J Clin Nutr.**, v. 76, n. 6, p.1191–1201, 2002.

BHATTACHARYA, S. Natural Antimutagens: A Review. **Res. J. Med. Plant.**, v. 5, n. 2, p. 116-126, 2011.

BONUCCI, E. et al. Ipriflavone inhibits osteoclast differentiation in parathyroid transplanted parietal bone of rats. **Calcif. Tissue Int.**, v. 50, n. 4, 1992a.

BONUCCI, E. et al. Cytological and ultrastructural investigation on osteoblastic and preosteoclastic cells grown *in vitro* in the presence of ipriflavone: Preliminary results. **Bone Miner.**, v. 19, p. 15-25, 1992b.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: patologia geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 367 p.

BROUNS, F. Soya isoflavones: a new promising ingredient for the health foods sector. **Food Res. Int.**, v. 35, p. 187-93, 2002.

BROWN, S.E. **Ipriflavone: Osteoporosis Education Project Analysis**. p. 1-10, 2000. Disponível em: <<http://www.betterbones.com/foundation/ipriflavone.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

BÜCHLER, P. et al. Antiangiogenic activity of genistein in pancreatic carcinoma cells is mediated by the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 and the down-regulation of VEGF gene expression. **Cancer**. v. 100, n. 1, p. 201-210, 2004.

BUNKOVA, R.; MAROVA, M.; NEMECK. Antimutagenic Properties of Green Tea. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 60, p. 25–29, 2005.

CAI, Q.; WEI, H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. **Nutr. Cancer**, v. 25, n. 1, p. 1-7, 1996.

CAMICI, G.G. et al. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation. **Circulation**, v. 114, p. 1512-1521, 2006.

CASTILHO, A.C.C. et al. Soja na nutrição humana. **IMeN.**, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.nutricaoclinica.com.br/20050811391/alimentos-funcionais-soja/soja-na-nutricao-humana>>. Acesso em: 8 nov. 2011.

CECCHINI, M.G.; FLEISCH, H.; MÜHLBAUER, R.C. Ipriflavone inhibits bone resorption in intact and ovariectomized rats. **Calcif. Tissue Int.**, v. 61, 1997.

CHENG, S.-L, et al. Stimulation of human osteoblast differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. **Calcif. Tissue Int.**, v. 55, n. 5, p. 356-336, 1994.

CHOY, W.N. Regulatory genetic toxicology tests. In: _____. (Ed.) **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. Nova York: Marcel Dekker, 2001. p. 93-113.

CHUNG, H.J. et al. Effects of enzyme inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous ipriflavone in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, n. 4, p. 449-457, 2006.

CHUNG, H.J. et al. Effects of *E. coli* lipopolysaccharide on the pharmacokinetics of ipriflavone and its metabolites, M1 and M5, after intravenous and oral administration of ipriflavone to rats: Decreased metabolism of ipriflavone due to decreased

expression of hepatic CYP1A2 and 2C11. **J. Pharm. Sci.**, v. 97, n. 11, p. 5024-5036, 2008.

CIVITELLI, R. *In vitro* and *In vivo* effects of ipriflavone on bone formation and bone biomechanics. **Calcif. Tissue Int.**, v. 61, 1997.

COLDITZ, G.A. Relationship between estrogen levels: use of hormone replacement therapy and breast cancer. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 90, n. 11, p. 814-23, 1998.

COLVIN, O.M. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. **Curr. Pharm. Des.**, v. 5, n. 8, p. 555-560, 1999.

COLVIN, M.; HAIT, W.N. Alkylating agents and platinum antitumor compounds. In: HONG, W.K. et al (Ed.). **Holland-Frei Cancer Medicine**. 8. ed. China: BC Decker, 2009. p. 633-644.

COOPER G.M. The cancer cell. In: _____. **Oncogenes**. 2. ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1995. cap. 1, p. 3-18.

DAWIDOWICZ, A.L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chem.**, v. 131, p. 1037-1043, 2012.

DeFLORA, S. et al. DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. **Mutat. Res.**, v. 366, n. 3, p. 197-238, 1996.

DeFLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. 402, p. 151-158, 1998

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

DELFINO M.; DAY M. E. Once upon a time. In: _____. **Cancer: We live and die by radiation**. 1.ed. EUA: MoBeta Publishing, 2006. p. 1-4.

DELMANTO, R.D. et al. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutat. Res.**, v. 496, p. 15-21, 2001.

DEVASAGAYAM, T.P.A. et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **J. Assoc. Physicians India**, v. 52, p. 794-804, 2004.

EL-BAYOUMY, K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. **Mutat. Res.**, v. 475, p. 123-139, 2001.

ESTEVEZ, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Rev. Nutr.**, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2001.

EVANS, M.S.; REID, K.H.; SHARP, J.B. Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. **Neurosci. Lett.**, v. 150, n. 2, p. 145-148, 1993.

FAGUNDES, F.A. et al. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Rev. Eletrônica Farm.**, v. 2, n. 1, p. 24-29, 2005. Disponível em: <<http://revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/1944/1877>>. Acesso em: 10 set.

FENECH, M. *In vitro* micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods Mol. Med.**, v. 111, p. 3-32, 2005.

FERGUSON, L.R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutat. Res.**, v. 307, n. 1, p. 395-410, 1994.

FERRARI, R.A.; DEMIATE, I.M. Isoflavonas de soja: uma breve revisão. **Biol. Health Sci.**, v. 7, n. 1, p. 39-46, 2001.

FILHO, P.R.; FERREIRA, L.A.; GOUVÊA, C.M.C.P. Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens* ("barbatimão") leaf extracts. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 21, n. 6, p. 1000-1005, 2011.

FOLLÉZOU, J.B.; BIZON, M. Cancer chemotherapy induces a transient increase of serum-iron level. **Neoplasma**, v. 33, n. 2, p. 225-231, 1986.

FONTAINE, K.R. et al. Results of soy-based meal replacement formula on weight, anthropometry, serum lipids & blood pressure during a 40-week clinical weight loss trial. **Nutr. J.**, v. 14, n. 2, 2003.

GAIKWAD, P.; BARIK, A.; PRIYADARSINI, K.I. Antioxidant activities of phenols in different solvents using DPPH assay. **Res. Chem. Intermed.**, v. 36, p. 1065-1072, 2010.

GALVÃO, L.P. et al. Avaliação do endométrio em menopausadas após o uso de isoflavonas. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 6, p. 419-423, 2006.

GAMBACCIANI, M. et al. Effects of ipriflavone administration on bone mass and metabolism in ovariectomized women. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 16, n. 5, p. 333-337, 1993.

GARNET, A.L. et al. Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: The Women's Health Initiative Randomized Trial. **JAMA**, v. 290, n. 13, p.1739-1748, 2003.

GARÓFOLO, A. Implicações do estresse oxidativo em crianças com câncer. **Pediatr. Mod.**, v. 39, p. 132-138, 2003.

GASIOROWSKI, K.; BROKOS, B. Evaluation of antimutagenic effect of trodalazine in cultured lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 15, n. 2, p. 137-141, 2000.

_____. DNA repair of hydrogen peroxide-induced damage in human lymphocytes in the presence of four antimutagens. A study with alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v. 6, n. 4, p. 897-911, 2001b.

GASIOROWSKI, K.; BROKOS, B.; LESZEK, J. Antimutagenic activity of fluphenazine in short-term test. **Mutagenesis**, v. 16, n. 1, p. 31-38, 2001a.

GEBHART, E. Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. **Mutat. Res.**, v. 267, p. 211-220, 1992.

GENNARI, C. et al. Effect of chronic treatment with ipriflavone in postmenopausal women with low bone mass. **Calcif. Tissue Int.**, v. 61, p. 19-22, 1997.

GENNARI, C. et al. Effect of ipriflavone – a synthetic derivative of natural isoflavones-on bone mass loss in the early years after menopause. **Menopause**, v. 5, n. 1, p. 9-15, 1998.

GENTILE, J.M. et al. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. **Mutat. Res.**, v. 402, p. 289-298, 1998.

GLEN, C.D.; DUBROVA, Y.E. Exposure to anticancer drugs can result in transgenerational genomic instability in mice. **PNAS.**, Doi: 10.1073, 2012.

GRADY, D. et al. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: A meta-analysis. **Obstet. Gynecol.**, v. 85, n. 2, p. 304-313, 1995.

HARRIS, D. M. et al. Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta-Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells. **Exp. Biol. Med.**, v. 230, n. 8, p. 558-568, 2005.

HAYATSU, H.; ARIMOTO, S.; NEGISHI, T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. 202, p. 429-446, 1988.

HAYES, J. et al. The rat bone marrow micronucleus test – study design and statistical power. **Mutagenesis.**, v. 24, n. 5, p. 419-424, 2009.

HEAD, K.A. Ipriflavone: an important bone-building isoflavone. **Altern. Med. Rev.**, v. 4, n. 1, p. 10-22, 1999.

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

HUNG, Y.-H.; HUANG, H.-Y.; CHOU, C.-C. Mutagenic and antimutagenic effects of methanol extracts of unfermented and fermented black soybeans. **Inte. J. Food Microbiol.**, v. 118, n. 1, p. 62-68, 2007.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

IMHOF, M.; MOLZER, S.; IMHOF, M. Effects of soy isoflavones on 17 β -estradiol-induced proliferation of MCF-7 breast cancer cells. **Toxicol. in vitro**, v. 22, n. 6, p. 1452-1460, 2008.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer ?**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> Acesso em: 04 jan. 2011a.

_____. **Bases do tratamento.** p. 369-556. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap7.pdf>>. Acesso em 10 dez. 2011b.

_____. **Estimativa 2012:** Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2011c.

IWASAKI, T. et al. Ipriflavone inhibits osteolytic bone metastasis of human breast cancer cells in a nude mouse model. **Int. J. Cancer**, v. 100, n. 4, p. 381-387, 2002.

JENKINS, D.J.A. et al. Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, n. 2, p. 365-372, 2002.

KADAM, S.S.; MOHADIK, K.R.; BOTHARA, K.G. Anti-neoplastic agents. In: LEMKE, T.L. et al (Ed.) **Foye's Principles of medicinal chemistry**. 6. ed. Bangalori: Nerali Prakashan, v. 1, 2007. p. 141-166.

KATASE, K. et al. Effects of ipriflavone on bone loss following a bilateral ovariectomy and menopause: a randomized placebo-controlled study. **Calcif. Tissue Int.**, v. 69, n. 2, p. 73-77, 2001.

KHOURI, J. et al. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of na aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genet. Mol. Biol.**, v. 30, n. 2, p. 442-448, 2007.

KIM, S.H.; LEE, M.G. Pharmacokinetics of ipriflavone, an isoflavone derivative, after intravenous and oral administration to rats Hepatic and intestinal first-pass effects. **Life Sci.**, v. 70, p. 1299-1315, 2002.

KIM, S.H.; LEE, J.; LEE, M. Pharmacokinetics and tissue distribution of ipriflavona, an isoflavone derivative, after intravenous administration to rabbits. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 21, n. 4, p. 147-156, 2000.

KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. et al. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its fractions against uv-induced mutations in bacterial and yeast cells. **Arch. Biol. Sci.**, v. 57, n. 3, p. 163-172, 2005.

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

KURZAWA-ZEGOTA, M. et al. The protective effect of the flavonoids on food-mutagen-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes from colon cancer patients. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 50, n. 2, p. 124-129, 2012.

LANCE, L.L. et al. **Medicamentos:** uma fonte abrangente para médicos e profissionais da saúde. 1. ed. São Paulo: Manole, 2009. 1709p.

LEE, D.Y. et al. Pharmacokinetics of ipriflavone and its two metabolites, M1 e M5, after the intravenous and oral administration of ipriflavone to rat model of diabetes mellitus induced by streptozotocin. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 38, n. 5, p. 465-471, 2009.

LEITE, M.O.R. Tratamento da osteoporose pós-menopausa. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 43, n. 6, p. 442-445, 1999.

LIU, J.-R.; CHEN, M.-J.; LIN, C.-W. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 7, p. 2467-2474, 2005.

MACGREGOR, J.T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutat. Res.**, v. 189, n. 2, p. 103-112, 1987.

MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova.** v. 23, n. 2, 2000.

MAMMADOV, R. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts from tubers and leaves of *Colchicum balansae* Planchon. **JMPR.** v. 3, n.10, p. 767-770, 2009.

MANDA, K.; BHATIA, A.L. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 19, n. 6, p. 367-372, 2003.

MANZI, S.; KAO, A.H. Systemic lupus erythematosus: C. treatment and assessment. In: KLIPPEL, J.H. et al. (Ed). **Primer on the rheumatic diseases.** 13. ed. Atlanta: Springer, 2008. p. 327-338.

MARKIEWICZ, L. et al. *In vitro* bioassays of non-steroidal phytoestrogens. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 45, n. 5, p. 399-405, 1993.

MAURO, M.O. et al. Atividade quimiopreventiva da fenilalanina contra danos mutagênicos pela administração aguda de ciclofosfamida em ratas grávidas e não grávidas, utilizando o teste do micronúcleo. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 20, n.3, p. 334-339, 2010.

MESSINA, M.J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, n. 3, p. 439-450, 1999.

MIN, K.; EBELER, S.E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 1, p. 96-104, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Como é o processo de carcinogênese?** Rio de Janeiro, 1996. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>. Acesso em 20 dez. 2011.

_____. 2011. **Saúde lança perfil do câncer para 2012.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3400/162/saude-lanca-perfil-%3Cbr%3Edo-cancer-para-2012.html>>. Acesso em: 4 jan 2012.

MITSCHER, L.A. et al. Natural antimutagenic agents. **Mutat. Res.**, v. 330, n. 1, p. 143-152, 1996.

MIYAUCHI, A. et al. Novel ipriflavone receptors coupled to calcium influx regulate osteoclast differentiation and function. **Endocrinology**, v. 137, n. 8, p. 3544-3550, 1996.

MIYAZAWA, M. et al. Antimutagenic activity of isoflavones from soyben seeds (*Glycine max* Merrill). **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 4, p. 1346-1349, 1999.

MOHANRAJ, P. et al. Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. **J. Appl. Physiol.** v. 84, n. 6, p. 1960-1966, 1998.

MONOSTORY, K.; VERECZKEY, L. Interaction of theophylline and ipriflavone at cytochrome P450 level. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.**, v. 20, p. 43-47, 1996a.

_____. The effect of ipriflavone and its main metabolites on theophylline biotransformation. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.**, v. 21, n. 1, p. 61-66, 1996b.

MONOSTORY, K. et al. Ipriflavone as an inhibitor of human cytochrome P450 enzymes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, n. 4, p. 605-610, 1998.

MOON, Y. et al. Characterization of cytochrome P450s mediating ipriflavone metabolism in human liver microsomes. **Xenobiotica**, v. 37, n. 3, p. 246-259, 2007.

MORALES-RAMÍREZ, P. et al. *In vivo* kinetics of micronuclei induction by bifunctional alkylating antineoplastic agents. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 207-213, 2004.

MOREIRA L.M.A. et al. Teste de linfócitos humanos no reconhecimento do efeito clastogênico e citotóxico da 5-fluoracil. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, v. 3, n. 1, p. 5-12, 2004.

MORITA, I. et al. Ipriflavone inhibits murine osteoclast formation *in vitro*. **Calcif. Tissue Int.**, v. 51, n. 1, p. 7-10, 1992.

MORSE, M.A.; STONER, G.D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 9, p. 1737-1746, 1993.

MUELLER, S.O. et al. Phytoestrogens and Their Human Metabolites Show Distinct Agonistic and Antagonistic Properties on Estrogen Receptor α (ER α) and ER β in Human Cells. **Toxicol. Sci.**, n. 80, n. 1, p. 14-25, 2004.

MURATA M. et al. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 3, n. 6, p. 793-802, 2004.

NAIM, M. et al. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. **J. Agric. Food Chem.**, v. 24, n. 6, p. 1174-1177, 1976.

NCI – NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Parceiro da rede de pesquisa sobre o câncer nos Estados Unidos - América Latina (US-LA CRN)**: Brasil. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/aboutnci/organization/olacpd/portugues/br/crn/brasil>>. Acesso em: 07 jan. 2012.

NOIPA, T. et al. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. **Food Res. Internat.**, v. 44, p. 798-806, 2011.

OLIVEIRA, R.J. et al. Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 28, n. 1, p. 120-124, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em: <<http://www.who.int/es/>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

_____. **Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world?** 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L.M. Biotransformação: importância e toxicidade. **Saúde Rev.**, v. 5, n. 9, p. 69-76, 2003.

PLEWA, M. J. et al. Isolating antigenotoxic components and cancer cell growth suppressors from agricultural by-products. **Mutat. Res.**, v. 480-481, p. 109-120, 2001.

POLÍVKOVÁ, Z. et al. Antimutagenic effect of genistein. **Czech. J. Food Sci.** v. 24, n. 3, p. 119-126, 2006.

PRIMO, M.S. et al. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de um biopolímero extraído do microorganismo *Agrobacterium radiobacter* em camundongos Swiss. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 3, p. 340-347, 2010.

QARI, S.H. *In vitro* evaluation of the anti-mutagenic effect of *Origanum majorana* extract on the meristematic root cells of *Vicia faba*. **Jof Taibah Univ. Sci. J.**, v. 1, p. 6-11, 2008.

RABELLO-GAY, M.N. et al. The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophosphamide in mouse bone marrow. **Mutat. Res.**, v. 3, n. 158, p. 181-188, 1985.

REGINSTER, J.-Y.L. Ipriflavone: pharmacological properties and usefulness in postmenopausal osteoporosis. **Bone and Miner.**, v. 23, n. 3, p. 223-232, 1993.

REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Produtos protéicos de soja. In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M (Ed.) **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. São Paulo: Manole, 2006. p. 355-402.

REN, W. et al. Flavonoids: Promising anticancer agents. **Med. Res. Rev.**, v. 23, n. 4, p. 519-534, 2003.

RIBEIRO, J.C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutat. Res.**, v. 695, p. 22-28, 2010.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K (Org). **Mutagenese Ambiental**. 1 ed. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

ROCHE, V.F. Cancer and Chemotherapy. In: LEMKE, T.L et al. **Principles os medicinal chemistry**. USA: Linpincott Williams & Wilkins, 2008. p.1147-1191.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chem.**, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROHATAGI, S. et al. Pharmacokinetics of ipriflavone and metabolites after oral administration of a corn-oil suspension relative to the osteofix tablet. **Am. J. Ther.**, v. 4, p. 229-238, 1997.

RONDELLI, I.; ACERBI, D.; VENTURA, P. Steady-state pharmacokinetics of ipriflavone and its metabolites in patients with renal failure. **Int. J. Clin. Pharmacol. Res.**, v. 11, n. 4, p. 183-192, 1991.

ROSSOUW, J.E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v. 288, n. 3, p. 321-33, 2002.

RUDDON R.W. **Cancer Biology**. 4. ed. Nova York: Oxford University Press, 2007. 553p.

RÜFER, C.E.; KULLING, S.E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 8, p. 2926–2931, 2006.

RUFINO, M.S.M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado técnico: EMBRAPA**. Fortaleza: 2007.

SALMON, S.E.; SARTORELLI, A.C. Quimioterapia do câncer. In: KATAZUNG, B.G (Ed). **Farmacologia básica & clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 629-655.

SARKAR, F.H.; LI, Y. Using Chemopreventive Agents to Enhance the Efficacy of Cancer Therapy. **Cancer Res.**, v. 66, n. 7, p. 3347-3350, 2006.

_____. Sensitization of Cancer Cells to Cancer Therapies by Isoflavone and Its Synthetic Derivatives. In: BONAVIDA, B (Ed.) **Sensitization of Cancer Cells for Chemo/Immuno/Radio-therapy**. Los Angeles: Humana Press; 2008. p. 327-335.

_____. Alteration in gene expression and proteomic profiles by soy isoflavone. In: MINE, Y.; MIYASHITA, K.; SHAHIDI, F. **Nutrigenomics and proteomics in health and disease**: Food factors and gene interactions. USA: Wiley-Blackwell, 2009. p. 181-200.

SASAMURA, H. et al. Antiproliferative and antiangiogenic activities of genistein in human renal cell carcinoma. **Urology**, v. 64, n. 2, p. 389-393, 2004.

SATO, S.-T; TOMITA, I. Short-Term Screening Method for the Prediction of Carcinogenicity of Chemical Substances: Current Status and Problems of an *in vivo* Rodent Micronucleus Assay. **J. Health Sci.**, v. 47, n. 1, p. 1–8, 2001.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCOOT, G.N.; ELMER, G.W. Update on natural product: drug interactions. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 59, n. 4, p. 339-347, 2002.

SELVAKUMAR, E. et al. Protective effect of lipoic acid on micronuclei induction by cyclophosphamide. **Arch. Toxicol.**, v. 80, n. 2, p. 115-119, 2005.

SEMERENE, B. País vai ampliar investimentos no setor oncológico. **Portal da Saúde: SUS.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/mobile/visualizarNoticia.cfm?cod=2830&tipo=noticia>>. Acesso em: 3 jan 2012.

SERPELONI, J.M. et al. Avaliação *in vivo* da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo. **Semina Ciênc. Biol. Saúde**, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2008.

SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am. J. Clin. Nut.**, v. 68, n. 6, p. 1333-1346, 1998.

SHUKLA, S. et al. Integrating genotype and phenotype information: an overview of the pharmGKB project. **Pharmacogenomics J.**, v. 1, n. 3, p. 167-170, 2001.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, L.A.S. **Estimativa 2010:** A incidência de Câncer no Brasil. 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 21 de abr. 2010.

SILVA, M.N.S. Flavonóides com capacidade antioxidante. **Química Aplicada.** Faculdade de Ciências de Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Disponível em: <dq.fct.unl.pt>. Acesso em: 07 nov. 2011.

SLADEK, N.E. Therapeutic efficacy of cyclophosphamide as a function of its metabolism. **Cancer Res.**, v. 32, p. 535-542, 1972.

SNYDER, R.D.; GILLIES, P.J. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative and topoisomerase II-interactive properties of bio-flavonoids in Chinese hamster V79 cells. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 40, p. 266-276, 2002.

SORIA J.C. et al. Chemoprevention of lung cancer. **Lancet Oncol.**, v. 4, n. 11, p. 659-669, 2003.

SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SUGUI, Marina Marico. **Mecanismos de antimutagenicidade do cogumelo *Agaricus brasiliensis* sobre lesões no DNA induzidas *in vivo* e *in vitro*.** 2006. 111 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Programa de Pós-Graduação da Faculdade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

SURH, Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768-780, 2003.

SZABO, M.R. et al. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Chem. Pap.**, v. 61, n. 3, p. 214-116, 2007.

TANI, S.; MATSUDA, K.; TANAKA, T. Induction of apoptosis in cultured rat gastric epithelial cells by ipriflavone: comparison with indomethacin. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 5, p. 647-651, 2004.

TE, C. et al. *In vivo* effects of chlorophyllin on the antitumour agent cyclophosphamide. **Int. J. Cancer**, v. 70, n. 1, p. 84-89, 1997.

TSAO A.S.; KIM E.S.; HONG W.K. Chemoprevention of Cancer. **CA Cancer J. Clin.**, v. 54, n. 3, p. 150-180, 2004.

TSUDA, M. et al. The effect of ipriflavone (TC-80) on bone resorption in tissue culture. **J. Bone Miner. Res.**, v. 1, p. 207–211, 1986.

VALADARES, M.C.; CASTRO, N.C.; CUNHA, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, n. 4, p. 631-638, 2007 .

VALENTE, M. et al. Effects of 1-year treatment with ipriflavone on bone in postmenopausal women with low bone mass. **Calcif. Tissue Int.**, v. 54, n. 5, p. 377-380, 1994.

VELASCO, R. et al. Effect of dimethyl sulfoxide on excitation-contraction coupling in chicken slow skeletal muscle. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 23, n. 2, p. 149-154, 2003.

WATERS, M.D. et al. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutat. Res.**, v. 350, n. 1, p. 109-129, 1996.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? **Free Radic. Biol. Med.**, v. 36, n. 7, p. 838-349, 2004

YANG, C.S.; BRADY, J.F.; HONG, J.-Y. Dietary effects on cytochromes P450, xenobiotic metabolism, and toxicity. **FASEB J.**, v. 6, p. 737-743, 1992.

YE, Y-B. et al. Soy isoflavones attenuate bone loss in early postmenopausal Chinese women A single-blind randomized, placebo-controlled trial. **Eur. J. Nutr.**, v. 45, n. 6, p. 327-334, 2006.

YOSHIDA, K. et al. Disposition of ipriflavone (TC-80) in rats and dogs. **Radioisotopes**, v. 34, n. 11, p. 618-623, 1985.

YUN, C. et al. Determination of ipriflavona in human plasma by LC-MS and its application in a pharmacokinetic study. **Biomed. Chromatogr.**, v. 26, p. 123-128, 2012.

**ANEXO A – Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da
Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES)**

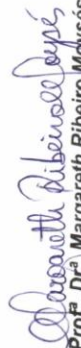


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 043/2010, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **“Estudo das possíveis ações mutagênica e antimutagênica da ipriflavona (7-isopropoxi-ipriflavona) em células de mamíferos *in vivo*”**, que tem como responsável o (a) docente **Maria do Carmo Pimentel Batitucci**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 16/08/2010. Este certificado expira-se em 30/08/2015.


Prof.ª Dr.ª Margareth Ribeiro Maysés
Presidente da CEUA / UFES

Vitória (ES), 31 de agosto de 2010.

APÊNDICE A – Teste de DPPH

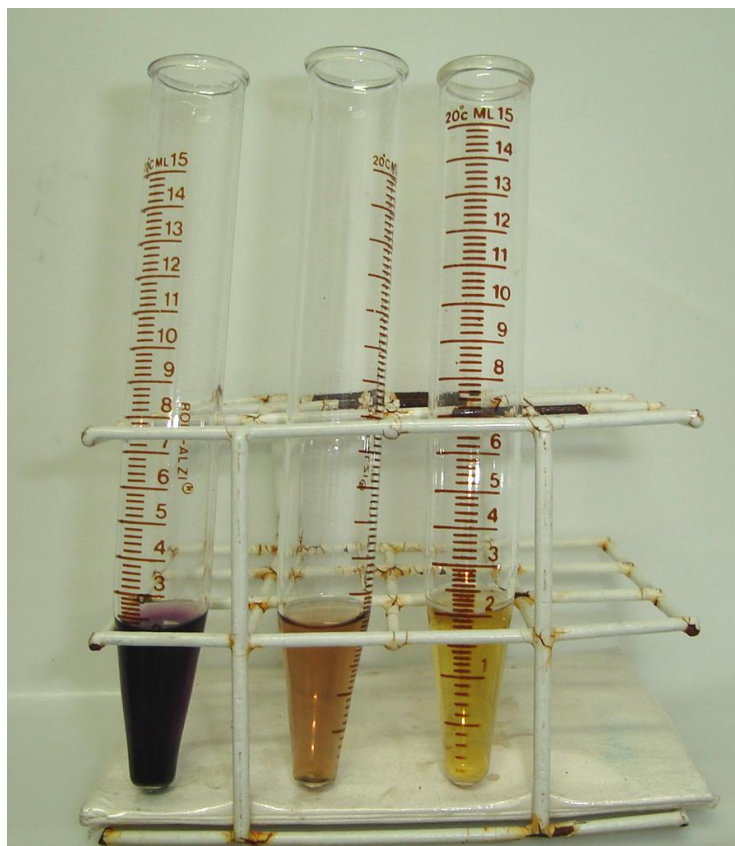


Figura 1: Fotografia demonstrativa do teste fotocolorimétrico do radical livre estável DPPH. Observa-se mudança simultânea da cor púrpura para amarelo claro, em diferentes graus, dependendo da capacidade de ação do agente antioxidante.

APÊNDICE B – Preparação citológica das células de medula óssea de camundongos

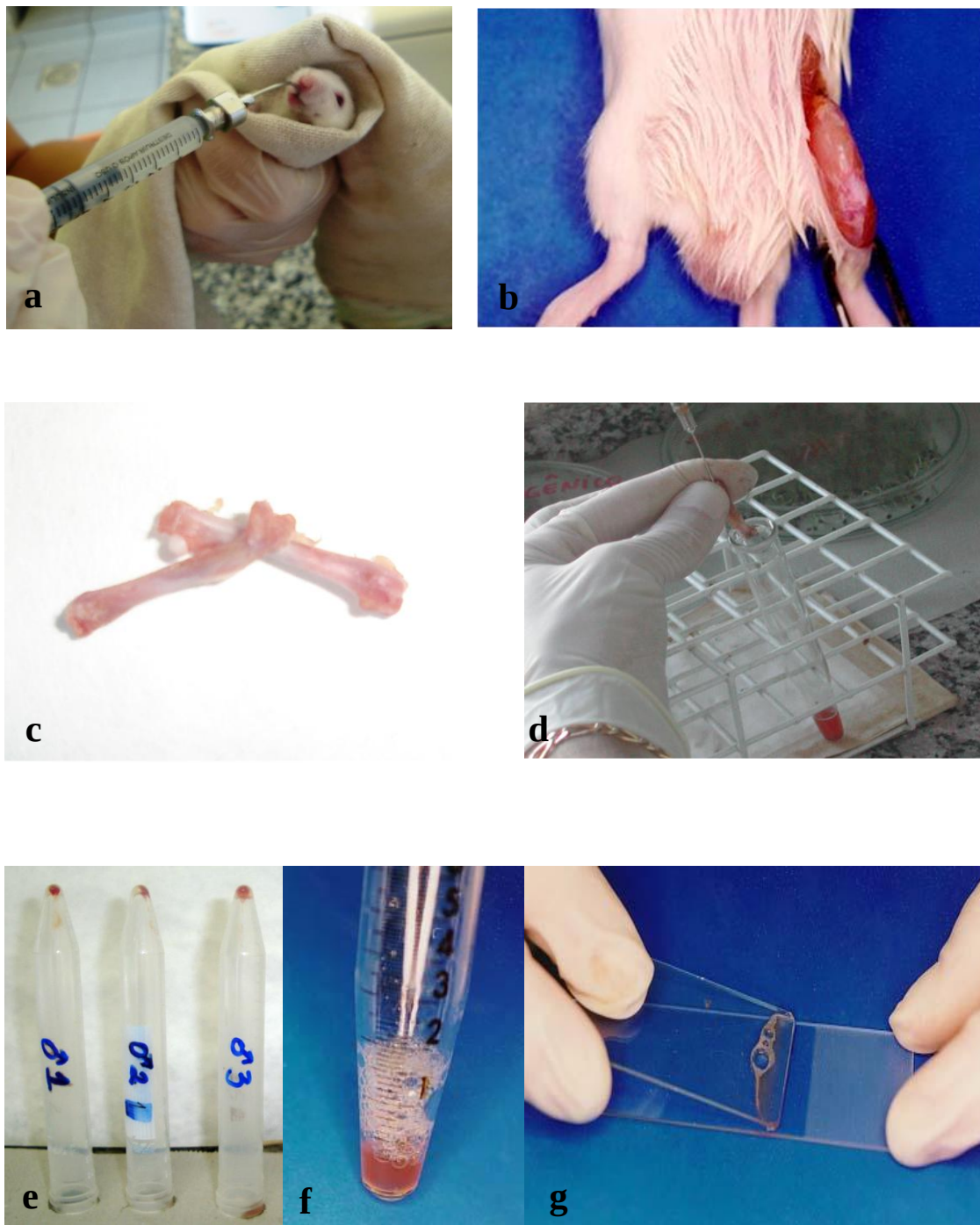


Figura 1: Ensaio de antimutagenicidade em camundongos albinos *Swiss* (*M. musculus*). **(a)** Tratamento oral (gavage). **(b)** Incisão para retirada do fêmur. **(c)** Ambos os fêmures de um camundongo. **(d)** Coleta da medula óssea do interior do fêmur com o auxílio de uma seringa previamente preenchida por soro bovino fetal. **(e)** Descarte do sobrenadante após centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm. **(f)** Ressuspensão do material celular. **(g)** Confecção das lâminas pelo método de esfregaço. Fonte: Arquivo pessoal e Ribeiro (2003).

APÊNDICE C – Coloração das lâminas e fotomicrografias de células da medula óssea de camundongos



Figura 1: Coloração das lâminas com Leishman, para a diferenciação das células sanguíneas.

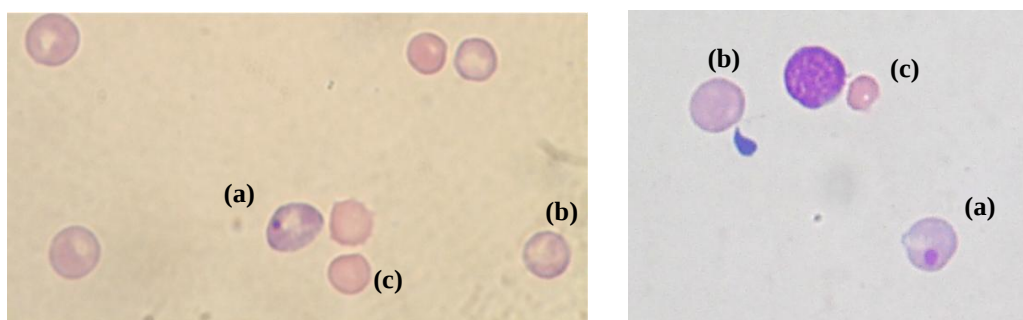


Figura 2: Fotomicrografia demonstrando a diferença na coloração de PCE e NCE: **(a)** eritrócito policromático micronucleado (MNPCE); **(b)** eritrócito policromático (PCE); **(c)** eritrócito normocromático (NCE).

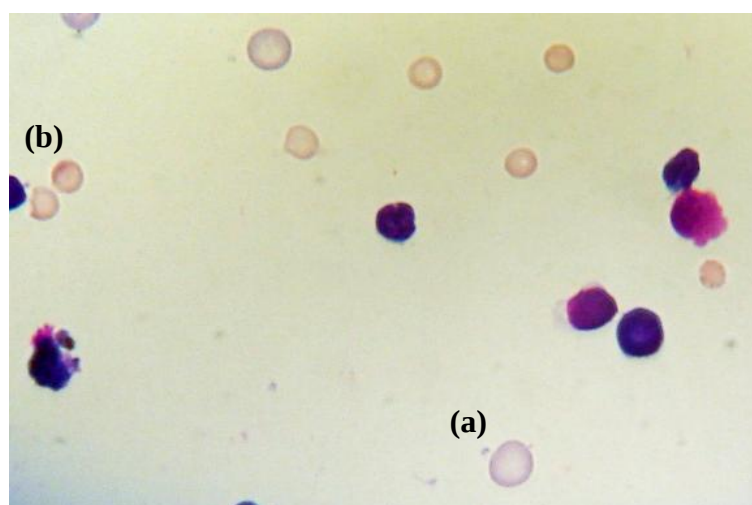


Figura 3: Fotomicrografia demonstrando a diferença de coloração de PCE **(a)** e NCE **(b)**. Eritrócitos policromáticos normalmente são maiores que normocromáticos.