

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO -
UNIFENAS

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
MUTAGÊNICO DO EXTRATO DE FRUTOS DE
Vaccinium corymbosum (MIRTILO) EM
CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE
CAMUNDONGOS *SWISS IN VIVO***

PATRÍCIA SCOTINI FREITAS

Alfenas - MG
2007

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO -
UNIFENAS

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
MUTAGÊNICO DO EXTRATO DE FRUTOS DE
Vaccinium corymbosum (MIRTILO) EM
CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE
CAMUNDONGOS *SWISS IN VIVO***

PATRÍCIA SCOTINI FREITAS

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação, na área de Genética, para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro

Alfenas - MG
2007

Freitas, Patrícia Scotini.

Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vacciniu corymbosum* (mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos *Swiss in vivo* / Patrícia Scotini Freitas. – Alfenas: UNIFENAS, 2007.

72p.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro

Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade José do Rosário Vellano.

1. *Vaccinium corymbosum*. 2. Micronúcleo. 3. Ensaio Cometa. 4. Testes de Mutagenicidade. I. Título.

CDU: 616.61 (043)

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de Mestrado intitulada “**Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum* (mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos *Swiss in vivo***”, elaborada por Patrícia Scotini Freitas e sob orientação do Prof. Dr. Edson Luis Maistro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde, área de Genética.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Edson Luis Maistro – Orientador
Universidade Estadual Paulista – UNESP (Marília)

Prof^a. Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa
Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS

Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG

Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori – Membro Suplente
Universidade Estadual Paulista – UNESP (Botucatu)

Dr. João Evangelista Fiorini – Membro Suplente
Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS

Alfenas, 27 de abril de 2007.

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam.”

(Bernard Shaw)

Aos meus pais, Antonio e Teresinha, razão do meu viver e do meu ser, exemplos de vida...É para e por vocês mais esta vitória.

À minha irmã Daniela, pela prontidão e ajuda tão imediata e com amor. Ensina-me que devemos ajudar, sem querer nada em troca. É assim que ela é comigo, sempre ajudando...

Ao presente mais lindo que Deus me deu, meu irmão Antônio Júnior, pela sinceridade e alegria que tanto me ajuda no dia a dia... Mesmo com a distância entre nossas cidades, está sempre perto, bem aqui, no meu coração.

Ao meu amor Marcos Tonelli, pela paciência, compreensão, apoio, incentivo... Companheiro sempre presente e fiel.

AGRADECIMENTO

A Deus, que me dá luz e me abençoa em todos os momentos, protegendo-me dos males e ensinando-me a passar pela vida em Seu caminho.

Ao reitor da UNIFENAS, prof. Edson Antonio Velano, por ter possibilitado cursar este mestrado.

Aos docentes deste mestrado, que tão prontamente nos transmitiram conhecimentos. A vocês professores, muito obrigada.

Aos meus alunos, incentivo nesta jornada, inspiração para seguir em frente a docência.

Ao meu querido orientador prof. Edson Luis Maistro, que me ensinou muito além da genética. Amigo, exemplo de professor, que mesmo longe, sempre esteve tão perto. Agradeço de coração por tudo que fez por mim.

Ao prof. Geraldo Rômulo Vilela Filho, supervisor do campus de Poços de Caldas, exemplo de pessoa, sempre conselheiro e pronto a ouvir. Agradeço a confiança, compreensão e solidariedade demonstrada ao longo de tantas idas e vindas.

À prof^a. Silvia Cristina Lopes Fernandez, coordenadora do curso de Enfermagem de Poços de Caldas, amiga, mãe e irmã. Incentivo constante, que às vezes acreditou em mim mais do que eu mesma. Responsável pelo remanejamento do meu horário como docente, tornando possível a frequência neste curso. Modelo de perseverança e fé em Deus. A você, gratidão eterna.

À prof^a. Giovanna Vallim Jorgetto, pela ajuda e carinho quando a motivação foi quesito indispensável para a superação dos obstáculos. Força para início desta caminhada. Parceira para outros projetos, amiga de verdade...

À Luciana Silva de Abreu, que me socorreu quando em prantos solicitava ajuda por apresentações de seminários que não abria, ajuste de figuras... Sempre pronta a ajudar.

À Lucimara Maria da Silva, técnica do Laboratório de Genética, socorro nos momentos difíceis... Inestimável auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Sérgio Faloni de Andrade, da Universidade do Oeste de Santa Catarina, campus de Videira, pela obtenção do extrato analisado.

Ao meu colega de curso Fábio de Souza Terra, que ao longo deste trabalho mostrou ser um grande amigo, auxílio nos momentos de dúvidas, nos telefonemas intermináveis em que discutíamos a metodologia científica...

À professora Érica Silva Bianchetti, pela ajuda nos momentos quando pensei que não conseguiria mais... Sempre disposta a ajudar, até na última hora. Amiga há pouco tempo, porém para toda vida.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta, ajudaram na realização deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Arbusto da planta <i>Vaccinium corumbosum</i>	37
FIGURA 2- Frutos de <i>Vaccinium corumbosum</i>	38
FIGURA 3- Classificação dos cometas (nucleóides) em células do sangue periférico de camundongos <i>Swiss</i> no ensaio SCGE. A , classe 0; B , classe 1; C , classe 2; D , classe 3.....	48

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1- Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCs) e razão de PCE/NCE observados em células do sangue periférico de camundongos *Swiss* fêmeas (F) e machos (M) tratados com o extrato de *Vaccinium corymbosum*, e os respectivos controles. Para cada tempo de amostra (48 e 72 h) foram analisadas 2.000 células. SDM = desvio padrão da média..... 52
- TABELA 2- Migração do DNA no ensaio cometa na avaliação de genotoxicidade do extrato de *Vaccinium corymbosum* em leucócitos do sangue periférico (coletados 4 h após o tratamento) de camundongos *Swiss* fêmeas (F) e machos (M) *in vivo*..... 53
- TABELA 3- Migração do DNA no ensaio cometa na avaliação de genotoxicidade do extrato de *Vaccinium corymbosum* em leucócitos do sangue periférico (coletados 24 h após o tratamento) de camundongos *Swiss* fêmeas (F) e machos (M) *in vivo*..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANAVA –	Análise de Variância
ANVISA –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
°C –	Grau Celsius
DL ₅₀ –	Dose Letal 50
DMSO –	Dimetil Sulfóxido
DNA –	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA –	Ácido Etileno–Diamino–Tetraacético
ENU –	Etil–Nitroso–Uréia
EP –	Eritrócito Policromático
EPAGRI –	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina
F –	Fêmea
g –	Gramas
h –	Horas
HCl –	Ácido Clorídrico
Kg –	Quilograma
LMP –	Baixo Ponto de Fusão
M –	Macho
M –	Mol
mA –	Micro Âmpere
mg –	Miligramas
ml –	Mililitros
µg –	Microgramas
µl –	Microlitro
mM –	Micro Mol
MN –	Micronúcleo
MNPCE –	Eritrócito Policromático Micronucleado
N –	Normal

Nº. –	Número
NaCl –	Cloreto de Sódio
NaOH –	Hidróxido de Sódio
NCE –	Eritrócito Normocromático
nm –	Nanômetro
NMP –	Ponto de Fusão Normal
PBS –	Solução de Tampão Fosfato
PCE –	Eritrócito Policromático
RNA –	Ácido Ribonucléico
SCGE –	Ensaio Cometa
SDM –	Desvio Padrão da Média
Tris –	Hidroximetil–Aminometano
UNIFENAS –	Universidade José do Rosário Vellano
UV –	Ultravioleta
V –	Volts
v/v –	Volume por volume

RESUMO

FREITAS, Patrícia Scotini. **Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum* (mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos *Swiss in vivo***. Orientador: Edson Luis Maistro. Minas Gerais: UNIFENAS, 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde, área de Genética).

Vaccinium corymbosum é um vegetal muito rico em antocianinas, que tem uma grande capacidade antioxidante e outros potenciais benefícios à saúde e, por este motivo, é altamente utilizado no mundo inteiro como planta medicinal. Neste trabalho, foi analisado o potencial mutagênico da administração aguda do extrato bruto de frutos desta planta, em células de camundongos, utilizando o ensaio cometa e o teste do micronúcleo. Os animais foram tratados oralmente com três diferentes concentrações do extrato (1000, 1500 e 2000 mg/kg de peso corporal). Células do sangue periférico de camundongos foram coletados 4 e 24 horas após o tratamento para a realização do ensaio cometa, e 48 e 72 horas para o teste do micronúcleo. Os resultados mostraram que o extrato de *Vaccinium corymbosum* não induziu aumentos estatisticamente significativos de danos ao ácido desoxirribonucléico nas células de sangue periférico. Entretanto, o teste do micronúcleo evidenciou um aumento significativo na média de eritrócitos policromáticos micronucleados, nas três concentrações testadas. Sugere-se que o consumo deste extrato seja moderado até que seu risco definitivo para os seres humanos seja melhor estabelecido.

PALAVRAS - CHAVE: *Vaccinium corymbosum*, micronúcleo, ensaio cometa, testes de mutagenicidade.

ABSTRACT

FREITAS, Patrícia Scotini. ***In vivo* evaluation of the mutagenic potential of the *Vaccinium corymbosum* (blueberry) extract on peripheral blood cells of Swiss mice.** Adviser: Edson Luis Maistro. Minas Gerais: UNIFENAS, 2007. Master Thesis (Mestrado em Saúde, Genetic area).

Blueberry *Vaccinium corymbosum* is a vegetable very rich in anthocyanins which have strong antioxidant capacity and other potential health benefits, and, because of that, is widely consumed in the world as medicinal plant. In this work, the mutagenic potential of the crude extract from this plant was studied in mice after acute treatment using the comet and micronucleus assay. Animals were treated orally with three different concentrations of the extract (1000, 1500 and 2000 mg/kg). Peripheral blood cells of Swiss mice were collected 4 and 24 hours after the treatment for the comet assay and 48 and 72 hours for the micronucleus test. The results have shown that the extract of *Vaccinium corymbosum* did not induce statistically significant increases in the average number of damages to deoxyribonucleic acid in peripheral blood cells. However, a significant increase in the mean of the micronucleated polychromatic erythrocytes was observed at three tested doses. It is suggested that its consumption could be moderate until a definitive risk for humans is established.

KEY - WORDS: *Vaccinium corymbosum*, micronuclei, comet assay, mutagenicity tests.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	GERAL.....	18
2.2	ESPECÍFICOS.....	18
3	JUSTIFICATIVA.....	19
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
4.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MUTAGÊNESE.....	20
4.2	AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE: CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TESTES UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	23
4.2.1	Teste do Micronúcleo(MN).....	23
4.2.1.1	Aplicações do Teste e Alguns Exemplos.....	26
4.2.2	<i>Single–Cell Gel Electrophoresis (SCGE)</i> – “Ensaio Cometa”	29
4.2.2.1	Peculiaridades do Ensaio Cometa... ..	29
4.2.2.2	Avaliação de Genotoxicidade.....	32
4.2.2.3	Aplicações Clínicas.....	33
4.2.2.4	Estudos do Reparo do DNA.....	34
4.2.2.5	Biomonitoramento Ambiental.....	35
4.3	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE <i>Vaccinium</i>	35
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1	MATERIAIS.....	40
5.1.1	Material Vegetal.....	40
5.1.1.1	Coleta e Obtenção do Extrato Bruto dos Frutos de <i>Vaccinium corymbosum</i>	40
5.1.2	Agentes Químicos.....	41
5.1.3	Animais Utilizados no Estudo.....	41

5.2	MÉTODOS.....	42
5.2.1	Os Grupos Experimentais.....	42
5.2.2	Aplicação do Ensaio Cometa (SCGE) para Detecção de Danos ao DNA em Células de Eucariotos	44
5.2.2.1	Preparo de Células... ..	44
5.2.2.2	Preparo das Lâminas... ..	44
5.2.2.3	Eletroforese e Coloração.....	46
5.2.2.4	Avaliação dos Danos ao DNA... ..	47
5.2.3	Metodologia para o Teste do Micronúcleo.....	48
5.2.4	Análise da Relação entre Eritrócitos Policromáticos/ Normocromático.....	50
5.2.5	Análise Estatística dos Ensaios de Mutagenicidade.....	50
6	RESULTADOS.....	51
7	DISCUSSÃO.....	55
8	CONCLUSÕES.....	60
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
10	ANEXO – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIFENAS.....	71
11	APÊNDICE – ARTIGO RESULTANTE.....	72

1 INTRODUÇÃO

Várias são as diferenças herdáveis que surgem repentinamente nos organismos vivos, ou seja, em seus cromossomos. Essas diferenças, denominadas mutações, desempenham importante papel na evolução de qualquer espécie, pois o seu aparecimento e sua detecção refletem na determinação de novos caracteres, ficando sujeitos à seleção natural e/ou artificial. A ocorrência de mutação pode ser espontânea ou provocada experimentalmente. Oppenheim e Fishbein (1965) já faziam referência da citogenética como uma técnica empregada para detectar alterações numéricas e/ou morfológicas dos cromossomos.

Por outro lado, é muito antiga a observação de que a exposição dos seres humanos a determinadas substâncias presentes no meio ambiente pode levar à mutagênese e posterior desenvolvimento de câncer. Usualmente é necessária a exposição repetida aos carcinógenos para que haja o desenvolvimento de tumores malignos. Esse desenvolvimento ocorre muito lentamente devido à natureza complexa da carcinogênese.

Sabe-se que produtos naturais consumidos tradicionalmente por grande parte da população podem apresentar potencial mutagênico, necessitando, portanto, de maiores avaliações e estudos para tal comprovação.

O uso medicinal de plantas é provavelmente tão antigo quanto a própria espécie humana. Mais de 150000 espécies de plantas foram estudadas e muitas delas contêm substâncias terapêuticas (HOYOS *et al.*, 1992; SURH e FERGUSON, 2003).

Com o advento da fitoterapia, diversos estudos têm sido extensamente realizados, objetivando o desenvolvimento da medicina alternativa.

A biodiversidade de espécies vegetais é enorme e o potencial de pesquisa científica igualmente vasto. Muitos estudos têm demonstrado que a avaliação da bioatividade de plantas medicinais fornece subsídios para utilizá-las como fármacos pelo homem (MOTTER *et al.*, 2004).

Vaccinium corymbosum, conhecida vulgarmente como “mirtilo” e “*blueberry*”, é uma espécie vegetal introduzida no Brasil na década de oitenta, inclusive no estado de Minas Gerais. A espécie possui importância comercial expressiva, além de estar havendo uma ampla utilização dos frutos como fonte de longevidade, pela sua composição nutricional.

De acordo com Toledo *et al.* (2003), a saúde é entendida como direito do cidadão e dever do Estado, o que leva todos os profissionais da área da saúde a refletir sobre as ações e ferramentas que possam ser utilizadas com vistas à promoção e manutenção da saúde e, conseqüentemente, uma melhor qualidade de vida. Ainda, consideram que cada vez mais se tem voltado os olhos à busca das plantas medicinais e/ou seus derivados como agentes terapêuticos naturais. O estímulo ao uso destes fitoterápicos tem como objetivo prevenir, curar ou minimizar doenças ou seus sintomas. Contudo, a transformação de uma planta em um medicamento deve visar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico.

Em estudo realizado com diferentes amostras comerciais de camomila, Brandão, Freire e Vianna–Soares (1998) afirmam que os resultados com a

camomila indicam a precariedade com que as plantas medicinais e fitoterápicos vêm sendo comercializadas, e confirmam a necessidade urgente de vigilância destes produtos no Brasil, visto que, no referido estudo, foram analisadas 27 amostras comerciais de camomila em Minas Gerais, em paralelo com a da Finlândia, sendo detectados contaminantes em todas as amostras, estando presentes insetos e outros.

Nos dias atuais, observa-se a atribuição de critérios mais rigorosos na avaliação de extratos de plantas comumente utilizados pela população e ao desenvolvimento de novas metodologias de pesquisa, visto que, cada vez mais, são encontrados agentes mutagênicos presentes nestes compostos. Evitar totalmente seu consumo seria, teoricamente, possível, mas na prática é difícil, devido a sua quantidade e variedade.

Deve-se, portanto, aprofundar em mais estudos para contrapor a expressão que comumente se ouve tanto dos usuários quanto dos profissionais de saúde que referem: “o natural não possui efeitos colaterais”. Sabe-se que tal afirmação é enganosa e remete a inúmeros riscos à saúde da população (TOLEDO *et al.*, 2003). Os autores afirmam que há muitas pesquisas com várias espécies vegetais, as quais são objetos de estudos nos programas de pós-graduação em todo o Brasil. Para eles, é necessário agregar grupos de pesquisadores interdisciplinares, multiprofissionais e interinstitucionais a fim de contribuir com o desenvolvimento de novos fitoterápicos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar a biossegurança, ao genoma de mamíferos, do extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum* em ensaios *in vivo*, no Laboratório de Genética da UNIFENAS campus Alfenas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar o potencial clastogênico do extrato bruto dos frutos de *Vaccinium corymbosum* em células de camundongos *Swiss in vivo* pelo Teste do Micronúcleo.
- Investigar o potencial genotóxico do extrato bruto dos frutos de *Vaccinium corymbosum* em células de camundongos *Swiss in vivo* através do Ensaio Cometa.

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento industrial tem como consequência inevitável a exposição do homem a um número crescente de agentes que, se por um lado lhe aumentam o conforto e a riqueza, constituem, por outro, um risco para sua saúde. Por isso é imprescindível estabelecer normas de uso de agentes, baseadas em trabalhos capazes de identificar os que têm potencialidades mutagênicas, teratogênicas ou carcinogênicas.

Desde que os fitoterápicos contêm compostos conhecidos por causarem doenças ou até a morte em animais e humanos, há um interesse considerável na determinação dos riscos que estes produtos possam apresentar à saúde.

Extratos de frutos de espécies de *Vaccinium* vêm sendo estudados em países industrializados, sendo constatado um alto teor de antocianinas em sua composição, com características antioxidantes, possuindo assim potenciais aplicações farmacológicas. Atualmente é alto e crescente o interesse na utilização do extrato de *Vaccinium corymbosum* por seres humanos. No entanto, é notório que a planta nunca foi investigada quanto ao seu potencial de causar mutações no material genético.

Justifica-se então este estudo pelo fato da espécie *Vaccinium corymbosum* ser usada popularmente como fonte antioxidante e de grande interesse na proteção contra o câncer, observando-se a inexistência de qualquer estudo envolvendo a avaliação da biossegurança do extrato desta planta com relação ao genoma de mamíferos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MUTAGÊNESE

A ingestão de alimentos é uma das principais vias de exposição do homem a diferentes compostos, visto que uma mistura complexa de agentes químicos é encontrada na dieta. Algumas substâncias presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos, carcinogênicos ou antimutagênicos; isto é, podem induzir mutações no ácido desoxirribonucléico (DNA) e/ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores, enquanto outras podem atenuar ou anular estes efeitos. Muitos compostos presentes nos alimentos, tanto naturalmente como adicionados ou produzidos durante o processamento, já foram testados quanto à mutagenicidade ou antimutagenicidade em diferentes sistemas experimentais (ANTUNES e ARAÚJO, 2000).

O uso de agentes aos quais o indivíduo é exposto deve acompanhar o progresso científico e sofrer revisões e atualizações freqüentes (RABELLO-GAY; RODRIGUES e MONTELEONE-NETO, 1991; WEISBURGER, 1999).

A vulnerabilidade do material genético e agressões impostas pelo ambiente criou uma nova área de pesquisa – a Genética Toxicológica – na qual especialistas em genética, bioquímica, biologia molecular e toxicologia trabalham para estudar as lesões induzidas por substâncias químicas (BROWN, 1999; RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

No transcorrer da vida, o DNA sofre alterações denominadas de mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, na

divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo imprescindível para a evolução e diversidade das espécies. Muitas das mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular e, por consequência, não são detectáveis. Assim, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar vantagens ou um crescimento desordenado das células (RIBEIRO e MARQUES, 2003). A mutagenicidade é um prognóstico razoável para a carcinogenicidade. Os autores ainda completam que, após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, causando, assim, o aparecimento do câncer.

Quando a mutação não é letal para a própria célula, ela pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou transmitir-se às gerações seguintes (mutação germinal). A mutação pode ser espontânea ou induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos; quando incluindo células somáticas, pode levar a um processo carcinogênico no próprio indivíduo. Se ocorrer em células germinativas, pode produzir doenças ou malformações nas gerações futuras (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

Ribeiro (2003) concorda e acrescenta que uma mutação é definida como uma mudança na seqüência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. Os agentes que mudam a seqüência do DNA são tóxicos para o gene e são chamados, portanto, de genotóxicos. Uma vez que as mutações são freqüentemente associadas com o desenvolvimento de câncer e defeitos ao nascimento, o conhecimento do potencial genotóxico de um agente químico

industrializado ou naturalmente presente no ambiente, é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem.

As mutações e a cancerização estão estreitamente associadas, pois ambas representam alterações abruptas em uma única célula, permanentes e herdadas pelas células filhas. Por isso, os testes de mutagenicidade são para a pré-seleção de agentes químicos a serem avaliados, quanto a seu potencial carcinogênico, por testes de longa duração em roedores (RABELLO-GAY; RODRIGUES e MONTELEONE-NETO, 1991; WEISBURGER, 1999).

Conforme Takahashi (2003), existem três níveis de mutações: as mutações gênicas, as aberrações cromossômicas estruturais e as aberrações cromossômicas em número, como as aneuploidias, estas causadas por agentes aneugênicos e que surgem devido a perdas cromossômicas (número anormal de cromossomos) e defeitos na citocinese (BONATO; SHARAN e CHIUCHETTA, 2006).

Para Salzano (2002), há uma clara relação entre mutagênese, teratogênese e carcinogênese. Uma mudança no material genético (mutação) pode ocasionar mudanças morfológicas sérias, portanto, tornando-se teratogênica (surpreendente ou monstruoso); e a mutação pode também ser o evento desencadeador do processo que leva ao câncer, portanto, tornando-se carcinogênica.

Todas as células têm vários sistemas que renovam lesões no DNA ou, simplesmente, auxiliam as células a tolerá-las. Os sistemas de reparo de DNA constituem mecanismos de defesa extremamente eficientes que garantem a estabilidade do genoma e, conseqüentemente, a próxima existência da célula

e/ou do organismo. Esses sistemas eventualmente falham e algumas lesões podem alterar o código genético de modo permanente, causando mutações (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2003).

Para Antunes e Araújo (2000), camundongos ou ratos são frequentemente utilizados para avaliação da mutagenicidade em testes *in vivo*, tratando-se de sistemas celulares de mamíferos. Schnaider e Souza (2003) acrescentam que, ao se utilizarem camundongos, várias são as vantagens, como: facilidades de manuseio, da alimentação, da execução de procedimentos técnicos e de custo operacional.

Segundo Barros *et al.* (2005), há uma grande preocupação no que diz respeito à segurança no uso de extratos de plantas. Com a intenção de garantir a qualidade e segurança da fitomedicina, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil publicou em 24 de fevereiro de 2000 a resolução Nº. 17 (BRASIL, 2000) estabelecendo que os fitofármacos devem ser submetidos a ensaios toxicológicos pré-clínicos e clínicos.

4.2 AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE: CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TESTES UTILIZADOS NESTE TRABALHO

4.2.1 Teste do Micronúcleo (MN)

Agentes clastogênicos ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular, podem ser detectados, em uma primeira abordagem, pelo teste do

micronúcleo, realizado em mamíferos *in vivo* (HEDDLE, 1973; MAVOURNIN *et al.*, 1990). Para os autores, as substâncias a serem testadas são geralmente administradas a roedores e o efeito é verificado em esfregaços da medula óssea. O ensaio serve como um primeiro passo no estudo de compostos mutagênicos, tendo a vantagem de ser mais rápido que a análise de aberrações cromossômicas.

Segundo Salvadori, Ribeiro e Fenech (2003), o micronúcleo se constitui de uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal; são tipicamente arredondados, com diâmetro de 1/20 a 1/15 do diâmetro do eritrócito. Portanto, dessa maneira, o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou dano no aparelho mitótico.

Os micronúcleos, um ou vários por célula, resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula em anáfase (RIBEIRO; SALVADORI e MARQUES, 2003).

Os micronúcleos aparecem nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células precursoras. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo

principal da célula (origem do termo “micronúcleo”). Os micronúcleos podem também ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo. Nesta situação, o micronúcleo irá conter o centrômero do cromossomo (RIBEIRO, 2003).

O autor continua dizendo que os micronúcleos são analisados em eritrócitos policromáticos de medula óssea de camundongos ou ratos. Os resultados positivos obtidos com o teste do micronúcleo fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada. Sob condições experimentais apropriadas, os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica *in vivo*.

Segundo o procedimento original (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1976), os micronúcleos são contados nos eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expõem seu núcleo, ao se transformarem em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis. Os eritrócitos jovens são policromáticos (ácido ribonucléico– RNA– positivos), isto é, coram-se em azul e não em vermelho. Se forem contados os micronúcleos apenas nesse tipo de célula, haverá a segurança de que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. Como o período entre a última divisão e a formação do eritrócito policromático (EP) é de 8 a 12 horas, é óbvio que só serão encontrados micronúcleos induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo no qual os micronúcleos podem ser detectados corresponde à duração do estágio de policromático, entre 10 a 24 horas.

Os eritrócitos policromáticos de sangue periférico de camundongos também podem ser utilizados no teste, uma vez que as células micronucleadas

não são eliminadas pelo baço, como ocorre nos ratos. Apenas deve-se ter o cuidado de coletar essas células após pelo menos 36 horas da administração da substância teste, que é quando os eritrócitos micronucleados começam a aparecer na corrente circulatória (HAYASHI *et al.*, 1990).

A taxa espontânea de eritrócitos policromáticos com micronúcleo é baixa e consistente, cerca de três por 1000, ou seja, seis por 2000 (RABELLO-GAY, 1991).

4.2.1.1 Aplicações do Teste e Alguns Exemplos

Ribeiro (2003) refere ser o teste do micronúcleo um método desenvolvido para se avaliar, *a priori*, a habilidade de substâncias para induzir dano cromossômico estrutural e/ou numérico em células em estágio de divisão, na medula óssea. A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas é freqüentemente utilizada como um indicativo para o câncer. Todos os testes de toxicidade genética utilizados rotineiramente para propósitos regulatórios são testes de mutação. Com relação à avaliação de risco para o câncer, os resultados dos testes de toxicidade genética são utilizados para a identificação de agentes mutagênicos. Por outro lado, se um agente é conhecido para ser um carcinógeno, o conhecimento da sua genotoxicidade fornece informações a respeito do mecanismo da carcinogenicidade, informação importante para a seleção das metodologias de caracterização de risco.

São diversos os trabalhos utilizando a técnica do micronúcleo para avaliação de mutagenicidade e/ou antimutagenicidade de vários compostos aos quais os seres humanos estão expostos. A análise do inseticida Nuvacron pelo teste do micronúcleo revelou um efeito genotóxico do mesmo nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/Kg (PEITL JÚNIOR; SAKAMOTO–HOJO e CÓLUS, 1996). Scher *et al.* (2000), analisando o potencial genotóxico do Saião, planta cujo extrato é amplamente utilizado como antiinflamatório por seres humanos, relataram que o extrato aquoso da referida planta não apresentou ação mutagênica em camundongos pelo teste do micronúcleo. Delmanto *et al.* (2000) relataram que o chá do cogumelo *Agaricus blazei*, conhecido como “cogumelo do sol” apresentou efeito protetor contra a mutagenicidade da ciclofosfamida em camundongos *Swiss*, também através da análise de micronúcleos, tanto em eritrócitos policromáticos da medula óssea quanto em reticulócitos do sangue periférico. Da mesma forma, Rampazo *et al.* (2002) observaram, pelo teste do micronúcleo, um efeito protetor da clorofilina, um sal obtido da clorofila, contra mutações induzidas pela mitomicina C *in vitro* em células de *hamster* chinês.

Em estudo realizado por Pacheco e Hackel (2002), o teste do micronúcleo foi utilizado para avaliar a atividade genotóxica de produtos agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul. Afirmam também que o teste do micronúcleo é um ensaio biológico eficiente para monitorar populações expostas a misturas agroquímicas.

Giri *et al.* (2002) avaliaram o potencial mutagênico do Malathion, um inseticida comumente utilizado na agricultura, nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg. Foi testada a administração em pintinhos por via oral e por via intraperitoneal,

sendo utilizado o teste do micronúcleo em células da medula óssea e de sangue periférico. Os resultados mostraram um aumento dose-dependente na frequência de micronúcleos em ambos os testes, acusando a capacidade mutagênica e também citotóxica do inseticida. Da mesma forma, Zaroni *et al.* (2005) observaram efeito clastogênico do extrato de caule de *Austroplenckia populnea*, utilizando os testes do micronúcleo e de aberrações cromossômicas. O extrato vem sendo estudado quanto ao seu potencial de reduzir a produção de espermatozóides. Os resultados obtidos evidenciaram potencial clastogênico do mesmo em células de ratos *Wistar*, sendo que, por sugestão dos autores, o seu uso por seres humanos deve ser interrompido até que sejam feitas investigações adicionais.

Maistro *et al.* (2005) avaliaram o potencial mutagênico do óleo essencial de *Copaifera duckey* em células de ratos *Wistar*, utilizando a análise de aberrações cromossômicas em células da medula óssea e o teste do micronúcleo em células de sangue periférico e observaram apenas um efeito citotóxico do óleo em altas concentrações. Similarmente, Espósito *et al.* (2005) investigaram o potencial mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto de *Hypericum brasiliense*, combinando o teste do micronúcleo com a análise de aberrações cromossômicas em células da medula óssea de ratos *Wistar* e não observaram aumento significativo de mutações nas concentrações testadas.

4.2.2 *Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE)* – “Ensaio Cometa”

4.2.2.1 Peculiaridades do Ensaio Cometa

De acordo com Klaude *et al.* (1996), o ensaio alcalino ($\text{pH} > 13$) *Single-Cell Gel Electrophoresis* é um procedimento para avaliar lesões no DNA, envolvendo aplicação de corrente elétrica nas células, o qual resulta no transporte de fragmentos de DNA para fora dos núcleos. A imagem obtida dessa migração de DNA lembra um cometa com uma cabeça e uma cauda, originando assim o termo ensaio cometa.

A corrida de células únicas em gel de eletroforese (SCGE), também conhecida como “Ensaio Cometa”, trata-se de um método muito sensível e de confiança para a detecção de quebras nas fitas de DNA, também permitindo análises da cinética do reparo de danos ocorridos ao material genético em células únicas (ROJAS; LOPEZ e VALVERDE, 1999). Essa técnica foi introduzida em 1988 por Singh *et al.*, os quais modificaram outras técnicas primárias de eletroforese em microgel.

O teste do cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. O teste do cometa é utilizado para detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo referido teste são passíveis de correção. Desta maneira, o teste cometa pode também ser utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada. Uma vez que danos no DNA são freqüentemente célula e tecido-específicos, uma metodologia como o teste do

cometa, que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula e, conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (GONTIJO e TICE, 2003).

Os autores continuam relatando que o teste cometa é essencialmente um teste comparativo. Assim, é sempre necessária a presença simultânea de controle negativo e positivo para os experimentos. Deve-se ter em mente que não existe célula sem dano no DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de mil lesões diárias no DNA da célula. Em linhas gerais, as amostras são preparadas em duplicata, ou seja, em duas lâminas. É conveniente posicionar as lâminas aleatoriamente dentro das cubas de eletroforese e, recomenda-se que pelo menos 25 cometas sejam analisados por réplica, totalizando um mínimo de cinquenta células por amostra. Os autores sobrescritos acrescentam ainda que é recomendável utilizar espécies de camundongos ou ratos e ainda utilizar várias dosagens até a obtenção de uma dose máxima tolerada. A substância deve ser administrada pela via que mais se aproxime àquela a que o homem é exposto e as amostras devem ser obtidas 3–6 horas e 23–25 horas após o tratamento. Geralmente não se utiliza uma amostra menor que quatro animais por grupo, pois se considera o mínimo de quatro medidas por grupo/ tratamento. Assim sendo, deve-se considerar a utilização de seis a dez animais por grupo para não correr o risco de invalidar o experimento, caso algum animal adoença ou vá a óbito.

O ensaio cometa permite uma direta determinação de danos e reparo ao DNA sob as mais diversas condições experimentais. Além disso, é uma técnica particularmente valiosa, porque permite a detecção de diferenças intercelulares

de mutações e reparo ao material genético em qualquer população de células eucarióticas. Modificações no protocolo do SCGE facilitam a detecção de quebras em uma única fita de DNA e sítios álcali-lábeis, quebras em ambas as fitas do DNA, bem como sítios onde houve reparo incompleto envolvendo excisão de bases. Além disto, é capaz de permitir o estudo de diferentes vias de reparo do DNA, tal como reparo por excisão de bases e por excisão de nucleotídeos (PIPERAKIS; VISCARDIS e TASSIOU, 1999).

Há também uma grande variedade de agentes mutagênicos que podem ser utilizados para estudar danos e reparo ao material genético com os procedimentos do SCGE (ROJAS; LOPEZ e VALVERDE, 1999). Após o tratamento, as células são embebidas em lâminas de agarose, lisadas e submetidas à eletroforese. Sob microscopia de fluorescência, células com acréscimo de danos ao DNA apresentam aumento na migração do DNA, partindo do núcleo em direção ao ânodo, formando uma imagem que se assemelha à cauda de um “cometa” após coloração com um fluorocromo que se ligue ao DNA. O ensaio cometa utiliza um pequeno número de células. Os resultados podem ser obtidos relativamente em um curto período de tempo, sendo, portanto, uma importante técnica no biomonitoramento de danos e reparo ao DNA de células humanas, animais e vegetais, constituindo-se em uma valiosa ferramenta de epidemiologia molecular (SINGH *et al.*, 1991; PIPERAKIS; VISCARDIS e TASSIOU, 1999).

Em particular, animais nativos, especialmente espécies de pequenos mamíferos, devem ser usadas para detectar riscos à população (FARBAIN; OLIVE e O’NEILL, 1995).

O ensaio SCGE é um importante teste de genotoxicidade e com grande potencial para fazer parte de uma bateria de ensaios *in vivo* e *in vitro* juntamente com outros testes já totalmente regulamentados para o estudo de lesões no DNA (RIBEIRO; MARQUES e SALVADORI, 2003).

4.2.2.2 Avaliação de Genotoxicidade

Diversos pesquisadores têm aplicado a versão alcalina do SCGE na área da genética toxicológica, avaliando *in vitro* e/ou *in vivo* a genotoxicidade de diversos compostos. Uma variedade de células normais e transformadas humanas, animais e de plantas têm sido usadas para estudos *in vitro*. Por outro lado, outras pesquisas utilizam ensaios *in vivo* em roedores, cães, além de outros. Esta técnica pode ser aplicada praticamente em qualquer órgão ou tecido, requerendo apenas uma pequena quantidade de células individualizadas para a análise. Assim, o SCGE permite a coleta de informações de danos ao material genético de diferentes células e tecidos para cada dose, permitindo a avaliação da heterogeneidade destes danos em diferentes células (ROJAS; LOPEZ e VALVERDE, 1999; RIBEIRO; SALVADORI e MARQUES, 2003).

A sensibilidade mostrada pelo ensaio SCGE o torna uma importante ferramenta nos estudos envolvendo avaliação de genotoxicidade. Uma revisão com a relação de mais de duas centenas de compostos analisados a respeito do potencial mutagênico pode ser encontrada em Rojas, Lopez e Valverde (1999).

4.2.2.3 Aplicações Clínicas

Também são diversas as aplicações do ensaio cometa na área clínica. Por essa técnica é possível avaliar níveis de danos ao DNA em células de diferentes tumores, em pacientes em tratamento por radioterapia. Devido ao pequeno número de células necessárias para as análises, a coleta de pequena quantidade de sangue ou de tecidos sólidos por uma simples biópsia já fornece material suficiente para as análises (RIBEIRO; SALVADORI e MARQUES, 2003).

Diferenças na resposta à radiação em tumores do mesmo tipo, tamanho e grau, geralmente têm sido atribuídas à heterogeneidade das células tumorais e, em particular, a diferenças na radiosensibilidade intrínseca, cinética do crescimento do tumor e a presença de subpopulações celulares resistentes, tais como células hipóxicas, e a respeito destas, o SCGE pode fornecer informações sobre um diferente número de propriedades das células tumorais sobre as quais se conhece a resposta inerente a um tratamento em particular, proporção de células ativamente proliferantes em relação à condição de falta de oxigênio (FAIRBAIRN; OLIVE e O'NEIL, 1995).

Tice, Straus e Peters (1992) avaliaram, através o ensaio cometa, danos ao DNA em linfócitos de sangue periférico criopreservados, obtidos de onze pacientes com câncer na região do tórax, tratados com altas doses de ciclofosfamida e cisplatina, e que fizeram, posteriormente ao tratamento, um autotransplante da medula. A quimioterapia resultou em um significativo, mas variável aumento de danos ao DNA nas células de todos os pacientes.

Outra aplicação potencialmente interessante deste ensaio foi encontrada em nível basal de danos ao DNA em linfócitos de pacientes com diferentes classes de câncer e ainda sem nenhum tratamento. Nestes, as mutações no DNA foram maiores do que aquelas observadas em pacientes não cancerosos. O nível relativo maior de danos ao DNA em pacientes com câncer pôde indicar que a malignidade da enfermidade está associada diretamente ao aumento de danos ao DNA ou que estes pacientes têm uma maior fragilidade no DNA em relação aos indivíduos saudáveis (VAGHEF *et al.*, 1997).

4.2.2.4 Estudos do Reparo do DNA

Singh *et al.* (1990) avaliaram o efeito da idade sobre o reparo de quebras. Aplicaram o ensaio cometa para medir danos e reparos ao DNA em linfócitos de sangue periférico obtido de pacientes saudáveis, cujas células foram submetidas à radiação X *in vitro*. Em todos os indivíduos, o tempo médio de reparo dos danos ao DNA foi de 2 horas em incubação à 37° C. Entretanto, devido à vantagem deste ensaio permitir a análise de células únicas, foi possível observar a presença de um pequeno número de células com danos ao material genético após as 2 horas, ocorrência que era significativamente mais comum em células de indivíduos mais idosos. Outra importante face deste tipo de análise envolvendo o reparo de quebras nas fitas de DNA, foi permitir o reconhecimento de indivíduos com diferentes capacidades de reparo.

Agentes como a radiação ultravioleta (UV) produzem lesões no DNA que não formam diretamente quebras nas fitas e que podem ser detectadas pelo

ensaio cometa. Deste modo, este ensaio pode também ser utilizado como uma ferramenta diagnóstica para *Xeroderma pigmentosum*, e outras síndromes caracterizadas por defeitos no reparo por excisão, causado pela radiação UV. A detecção de sítios de reparo por excisão pode ser feita pela versão alcalina do ensaio, com a inclusão de inibidores de reparo, inibidores de síntese de DNA ou terminadores de cadeia (ROJAS; LOPEZ e VALVERDE, 1999).

4.2.2.5 Biomonitoramento Ambiental

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para monitorar poluentes genotóxicos jogados no ambiente. A análise de células de indivíduos animais e vegetais que habitam e ocupam diferentes nichos no meio ambiente têm permitido monitorar poluições no solo, na água e até mesmo no ar. A potencial aplicação deste ensaio no biomonitoramento ambiental é usualmente ilimitada, uma vez que praticamente qualquer organismo pode ser utilizado neste tipo de investigação (ROJAS; LOPEZ e VALVERDE, 1999).

4.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *Vaccinium*

O gênero *Vaccinium* compreende cerca de duzentas espécies. Algumas espécies têm frutos comestíveis de importância econômica (LOHACHOOMPOL; SRZEDNICKI e CRASKE, 2004).

Mirtilo (*Vaccinium spp.*), *blueberry* em inglês; *arándano* em espanhol, é uma espécie ainda pouco conhecida no Brasil. Sua implantação data da segunda metade da década de 1980, em uma coleção de cultivares na Embrapa Clima Temperado (Pelotas, Rio Grande do Sul) e a primeira iniciativa comercial no país começou a partir de 1990, em Vacaria, também no estado do Rio Grande do Sul. Apesar de ser recente em nossas condições, o mirtilo é largamente cultivado na Europa e nos Estados Unidos. Nestas regiões, a espécie possui importância comercial expressiva, além de estar havendo uma ampla utilização dos frutos como fonte de longevidade, pela sua composição nutricional. Estes fatores têm impulsionado o cultivo em outras regiões não tradicionais, como na América do Sul, onde o Chile vem destacando-se como principal produtor. As principais espécies de mirtilo estão divididas em três grupos que são: *highbush*, *rabbiteye* e *lowbush* (HOFFMANN, 2005).

Nas últimas décadas, as antocianinas que algumas espécies de *Vaccinium* contêm receberam interesse devido as suas propriedades farmacológicas, como bioatividade, assim como atividade antioxidante (WANG; CAO e PRIOR, 1997; MAZZA *et al.*, 2002; LOHACHOOMPOL; SRZEDNICKI e CRASKE, 2004), antiinflamatória (YOU DIN *et al.*, 2002), proteção cardiovascular, propriedades antidiabéticas, propriedades que melhoram a visão e inibição de carcinogênese (CABRITA e ANDERSEN, 1999; CAMIRE, 2000; KATSUBE *et al.*, 2003).

Moyer *et al.* (2002) observaram grande capacidade antioxidante atribuídas a antocianinas e compostos fenólicos isolados de frutos de diversos genótipos de *Vaccinium*. A capacidade antioxidante foi determinada pela

capacidade de absorvência de radicais de oxigênio e pela força antioxidante de redução do ferro.

Matchett *et al.* (2005) observaram que flavonóides extraídos de *Vaccinium angustifolium* inibiram a atividade da metaloproteinase na matriz de células humanas de câncer de próstata. Segundo os autores, essa habilidade pode ser importante no controle da formação de metástase do tumor.

Vaccinium corymbosum, também conhecida por *highbush blueberry* (*high*–alto; *bush*–arbusto), faz parte do reino Plantae, sub–reino Tracheobionta, classe Magnoliopsida, subclasse Dileniidae, ordem Ericales, família Ericaceae (VACCINIUM, 2001).

Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*) são plantas arbustivas (FIG. 1) economicamente importantes, e seus frutos (FIG. 2) contêm grande quantidade de antioxidantes benéficos à saúde (PRIOR *et al.*, 1998; EHLENFELDT e PRIOR, 2001).



FIGURA—1. Arbusto da planta *Vaccinium corymbosum*. Fonte: Sítio, 2007.



FIGURA–2. Frutos de *Vaccinium corymbosum*. Fonte: Sítio, 2007.

Badescu *et al.* (1985) observaram que, para *Vaccinium corymbosum*, o uso de estacas de consistência mais herbácea é promissor para a maioria dos cultivares, sendo que cultivares de difícil enraizamento podem ser propagados mais facilmente através de estacas herbáceas.

Segundo Hoffmann (2005), a espécie *Vaccinium corymbosum* é a principal espécie do grupo *highbush*, mirtilo gigante, tetraplóide. Sua produção, dentre os demais grupos, é a de melhor qualidade, tanto em tamanho quanto em sabor dos frutos.

Katsube *et al.* (2003) acrescentam que, dentre frutos e vegetais, extratos de sementes têm alta atividade antioxidante. Afirmam que extratos de frutos de espécies de *Vaccinium corymbosum* inibem a indução da atividade de enzimas que provocam tumor.

Hoffmann (2005) afirma que o fruto da planta é uma baga de cor azul escura–*blueberry*, de formato achatado, coroada pelos lóbulos persistentes do cálice. Apresenta em seu interior várias sementes e tem sabor doce–ácido a ácido. A planta prefere solos ácidos (pH 4.0 a 5.2), com elevado teor de

matéria orgânica, boa retenção de umidade e boa drenagem. A exigência em frio hibernal varia de 300 a 1100 horas de frio (temperaturas inferiores ou iguais a 7.2°C). Os frutos podem ser consumidos *in natura* ou após congelamento, desidratação, envase ou fabrico de geléias e licores. Para o autor, as perspectivas para o cultivo no Brasil são promissoras, ocorrendo na maior parte das regiões do Sul do país.

Lohachoompol, Srzednicki e Craske (2004) demonstraram a manutenção do efeito antioxidante das antocianinas de *Vaccinium corymbosum* mesmo após a secagem do extrato e manutenção sob congelamento durante meses.

No Brasil, as áreas de cultivo ainda são incipientes, mas podem ser incrementadas como alternativa econômica, especialmente em pequenas propriedades (HOFFMANN; FACHINELLO e SANTOS, 1995).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho é uma pesquisa do tipo experimental, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade José do Rosário Vellano, campus Alfenas, com parecer favorável N°. 03A/2006 (ANEXO) e obedeceu aos preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2007).

5.1 MATERIAIS

5.1.1 Material Vegetal

5.1.1.1 Coleta e Obtenção do Extrato Bruto dos Frutos de *Vaccinium corymbosum*

Os frutos de *Vaccinium corymbosum* foram coletados no Campo Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina (EPAGRI), com sede no município de Videira, no mês de dezembro de 2005. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação em que são comercializados. Foram selecionados removendo-se os caules e folhas, permanecendo os frutos que não apresentavam danos, doenças ou infestação por pragas. Os mesmos foram mantidos em caixas de polietileno a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a preparação do extrato. Antes da extração, os

frutos congelados foram triturados num processador de alimentos. Os frutos triturados (1,0 kg) foram misturados em solução de etanol a 70% (v/v) à temperatura ambiente durante sete dias. O extrato bruto foi obtido por filtração da solução, seguida de sua concentração em pressão reduzida, resultando em 138 g de extrato final.

5.1.2 Agentes Químicos

O reagente etil-nitroso-uréia (ENU, CAS N°. 759-73-9) foi utilizado como agente mutagênico nos grupos de camundongos controle positivo dos ensaios cometa e teste do micronúcleo. Os outros reagentes principais utilizados foram obtidos dos seguintes laboratórios/fabricantes: agarose com ponto de fusão normal (*Normal Melting Point* – NMP) (Cat. N°. 15510-019: Invitrogen); agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point* – LMP) (Cat. N°. 15517-014: Invitrogen); sal de sódio *N-lauroyl sarcosine* (L-5125: Sigma) e ácido etileno-diamino-tetraacético (*Ethylene-diamine-tetraacetic acid* – EDTA –Merck).

5.1.3 Animais Utilizados no Estudo

Os animais utilizados no experimento de avaliação do potencial mutagênico foram camundongos *Swiss* (suíços) albinos, pesando em torno de 25-30g, com idade aproximada de doze semanas. Esses animais foram

provenientes do Biotério da UNIFENAS, campus de Alfenas, Minas Gerais, Brasil. Durante a pesquisa, os animais foram mantidos em caixas de polietileno adequadas (BAHTEN *et al.*, 2006), com cama tipo maravalha–serragem de madeira, atóxica, livre de materiais pontiagudos, absorvente, isolante térmico, não comestível pelos animais e confortável; ambiente com controle de temperatura ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$), com ciclo de 12h, luz/escuro (7 a.m. / 7 p.m.) e umidade ($52 \pm 5\%$). Aos animais foi fornecido água e comida à vontade (*ad libitum*). A água em bebedouros e a ração, em formato de péletes (marca LABINA–PURINA), em comedouros localizados nas tampas das gaiolas (PASSOS; LIMA FILHO e MENCARELLI, 2007).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Os Grupos Experimentais

Os experimentos foram desenvolvidos em cinco grupos de camundongos *Swiss*, constituídos cada um por três animais de cada sexo, portanto, seis animais por grupo (SCHNAIDER e SOUZA, 2003). Os tratamentos em cada grupo foram delineados considerando–se que a DL_{50} foi superior a 5000mg/kg. Sendo assim, foram testadas três doses do extrato, tendo–se como limite a dose máxima permitida por dia, que é de 2000 mg/kg de peso corpóreo (RIBEIRO; SALVADORI e MARQUES, 2003), sendo as outras duas de 1500 e 1000 mg/kg.

Os animais de cada grupo foram tratados com uma dose única do extrato, conforme descrito a seguir:

1. Controle positivo: Aos camundongos foi administrado intraperitonealmente 0,5 ml/100g de peso corporal da droga etil-nitroso-uréia dissolvida em tampão fosfato (phosphate-buffer solution – PBS) pH 6, na concentração de 50 mg/kg, sendo os animais submetidos à eutanásia 72 horas após a aplicação. Cerca de 10 microlitros (μ l) de sangue periférico da veia orbital foram coletados dos animais, nos tempos de 4h e 24h, para a realização do ensaio cometa, e 48h e 72h após a aplicação da droga, para a realização dos esfregaços do teste do micronúcleo.

2. Controle negativo: Os camundongos foram tratados com 0,5 ml de água destilada, via oral, sendo submetidos à eutanásia 72 horas após o tratamento. Cerca de 10 μ l de sangue periférico da veia orbital foram coletados dos animais, nos tempos de 4h e 24h, para a realização do ensaio cometa, e 48h e 72h após, para a realização dos esfregaços do teste do micronúcleo.

3. Tratamentos 1, 2 e 3: Os camundongos foram tratados com 0,5 ml de solução com o extrato de *Vaccinium corymbosum* nas concentrações de 1000mg/kg, no tratamento 1; 1500mg/kg, no tratamento 2 e 2000mg/kg, no tratamento 3, todos via oral, sendo os animais submetidos à eutanásia 72 horas após a aplicação. Cerca de 10 μ l de sangue periférico da veia orbital foram coletados dos animais, nos tempos de 4h e 24h, para a realização do ensaio cometa, e 48h e 72h após, para a realização dos esfregaços do teste do micronúcleo.

5.2.2 Aplicação do Ensaio do Cometa (SCGE) para Detecção de Danos ao DNA em Células de Eucariotos

A obtenção das lâminas com as células corridas em gel de eletroforese para a avaliação de danos ao DNA foi desenvolvida de acordo com o método descrito por Speit e Hartmann (1999), o qual é baseado no trabalho original de Singh *et al.* (1988), incluindo modificações introduzidas por Klaude *et al.* (1996), com modificações e consistindo em:

5.2.2.1 Preparo de Células

No presente experimento foram utilizados cerca de 10 µl de células de sangue periférico de camundongos *Swiss* albinos, obtidos a partir da veia orbital, por intermédio de um microcapilar heparinizado, coletados 4h e 24h após o tratamento de animais com o extrato e controles (SILVA *et al.*, 2000).

5.2.2.2 Preparo das Lâminas

- a) As lâminas foram limpas com etanol antes do uso.
- b) Preparada a agarose NMP a 1,5% (300mg em 20ml PBS) e fervida 2–3 vezes antes do uso. As lâminas limpas foram mergulhadas na agarose quente (>60°C), sendo retirada a agarose de um lado das lâminas, com papel absorvente. As lâminas foram colocadas em posição horizontal para

secar *overnight* em temperatura ambiente (procedimento rápido). Essas lâminas podem ser estocadas e usadas por várias semanas.

- c) Preparada a agarose LMP a 0,5% (100mg em 20ml PBS). Aquecida em microondas e colocada em banho-maria a 37 °C para uso.
- d) Em um *eppendorf*, adicionado 120µl de agarose LMP (37°C) e misturado com 10µl de suspensão celular. Com uma micropipeta, depositado este material em uma lâmina pré-preparada com agarose normal e coberto com lamínula. As lâminas foram acondicionadas em refrigerador durante 10–20 minutos. Após a adição das células nas lâminas, evitou-se exposição à luz direta (irradiação) para prevenção de danos adicionais no DNA. Todas as lâminas foram devidamente codificadas.
- e) As lamínulas foram removidas com cuidado e as lâminas depositadas em solução de lise – 89 ml de solução estoque (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7 para 10,0 com ~8g NaOH sólido, 890 ml de água destilada e 1% de sal de sódio N-lauroil sarcosinato, 1 ml de Triton X–100 (Merck) e 10 ml de Dimetil Sulfóxido – DMSO). Protegidas da luz, as lâminas foram levadas ao refrigerador (4°C) durante pelo menos 1 hora. As lâminas podem ser estocadas durante períodos longos na solução de lise gelada (mas geralmente não mais do que quatro semanas). Quando ocorrida a precipitação da solução de lise, as lâminas foram lavadas cuidadosamente com tampão PBS antes da eletroforese.

5.2.2.3 Eletroforese e Coloração

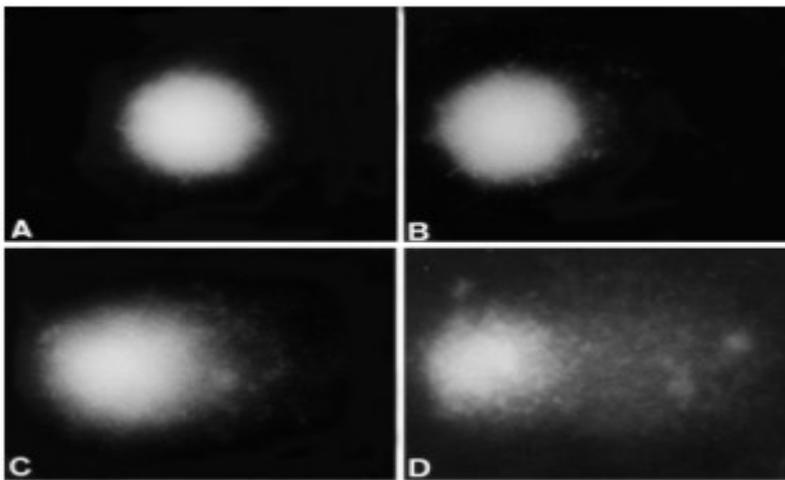
- a) Após o tempo da lise, removidas cuidadosamente as lâminas, estas foram depositadas na cuba horizontal de eletroforese, sendo preenchidos os espaços o máximo possível (completado com lâminas limpas, quando necessário).
- b) Adicionado o tampão, pH 13, de eletroforese (300mM NaOH e 1mM EDTA, preparado a partir de uma solução estoque de NaOH 10N e EDTA 200mM pH10,0) cuidadosamente, até que as lâminas ficassem cobertas. A cuba foi depositada sobre um recipiente com gelo (4°C).
- c) As lâminas foram deixadas imersas no tampão dentro da cuba por 20 minutos para a desnaturação do DNA.
- d) A seguir, iniciada a corrida de eletroforese com 25 volts (V) e 300 miliamperes (mA), os parâmetros foram acertados com remoção ou adição de tampão. A corrida de eletroforese ocorreu durante 20 minutos.
- e) Após a corrida de eletroforese, retiradas as lâminas com muito cuidado para não soltar a agarose, e depositados sobre as mesmas, cerca de 5 ml do tampão de neutralização (pH 7,5) (0,4 M Tris-HCl), deixando durante 5 minutos. Repetido mais duas vezes este procedimento (no total, 15 minutos de neutralização).
- f) As lâminas foram secas na posição inclinada em temperatura ambiente e fixadas com álcool etílico (100%) durante 10 minutos. Depois de secas, foram armazenadas em caixas na geladeira para posterior análise.

g) Quando da leitura das lâminas, depositados, sobre as mesmas, 30 µl de solução de brometo de etídio, preparada a partir de uma solução estoque de 200µg/ml, cobertas com lamínula, procedendo-se em seguida às análises.

Silva *et al.* (2000) afirmam que as lâminas mantêm uma boa imagem fluorescente por até 4 horas.

5.2.2.4 Avaliação dos Danos ao DNA

Para visualização dos danos ao DNA, as lâminas foram observadas em aumento 400x no microscópio de fluorescência Olympus BX-50, equipado com filtro de excitação de 515-560 nm (nanômetros) e um filtro de barreira de 590 nm. Foram analisadas, aleatoriamente, cem células de cada animal. Estas células (nucleóides) foram visualmente classificadas de acordo com o tamanho da cauda em quatro classes (FIG. 3): Classe 0 – sem dano, sem cauda; Classe 1 – dano pequeno, com cauda menor que o diâmetro da cabeça; Classe 2 – dano médio, com cauda maior que o diâmetro da cabeça, e Classe 3 – dano máximo, com cauda duas vezes maior que o diâmetro da cabeça. Cometas sem cabeças ou com cauda muito extensa foram excluídos da avaliação, pela probabilidade de representarem células apoptóticas, ou seja, células mortas (HARTMANN e SPEIT, 1997).



FIGURA–3. Classificação dos cometas (nucleóides) em células do sangue periférico de camundongos *Swiss* no ensaio SCGE. **A**, classe 0; **B**, classe 1; **C**, classe 2; **D**, classe 3). Fonte: Laboratório de Genética – UNIFENAS, 2007.

Após a leitura realizou-se o escore de cada tratamento multiplicando-se o número de núcleos observados em cada classe pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3), somando-se os resultados e obtendo-se o escore total de cada tratamento (SPEIT e HARTMANN, 1999).

5.2.3 Metodologia para o Teste do Micronúcleo

A técnica utilizada para a obtenção das células de sangue periférico para a investigação de ocorrência de micronúcleos é a de Schmid (1976), modificada por Zambrano, Targa e Rabello–Gay (1982), adaptada no laboratório de Genética da UNIFENAS, para a análise de sangue periférico, e que consiste em:

a) Administrada substância a ser testada por via oral ou intraperitoneal;

- b) Coletadas 2 a 3 gotas de sangue periférico de cada animal, a partir da veia orbital, nos tempos de 48 h e 72 h após o tratamento com as respectivas substâncias envolvidas no experimento;
- c) Transferidas as gotas de sangue para uma lâmina de microscopia e feito o esfregaço;
- d) Deixadas às lâminas secarem no ar;
- e) Fixadas em álcool 70% durante 10 minutos;
- f) Deixadas secar bem;
- g) As lâminas foram coradas com Giemsa diluído 1:10 em tampão fosfato pH 6,8 durante 15 minutos;
- h) Lavadas em água destilada.
- i) Depois de secas, armazenadas em caixas apropriadas para posterior análise;
- j) Quando da análise das lâminas, foram observadas em objetiva de imersão.

Para cada animal, foram analisados 4000 eritrócitos policromáticos, sendo 2000 no tempo de 48 h após o tratamento, e 2000 decorridas 72 h do tratamento. Tal análise foi possível com o auxílio de um contador de células digital, para a posterior determinação da média de eritrócitos micronucleados.

5.2.4 Análise da Relação entre Eritrócitos Policromáticos/ Normocromáticos

Nesta avaliação foram analisados 1000 eritrócitos do sangue periférico para cada tempo de coleta (48h e 72 h), sendo estabelecida a relação entre o número de eritrócitos policromáticos/normocromáticos em 1000 células.

A análise da relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos pode fornecer indícios de que o extrato está diminuindo a produção de novos eritrócitos (policromáticos). Se isto ocorrer, a droga poderá ser considerada citotóxica (GOLLAPUDI e MCFADDEN, 1995).

5.2.5 Análise Estatística dos Ensaios de Mutagenicidade

Todos os dados obtidos foram submetidos a cálculos estatísticos comparando os resultados dos animais tratados com as diferentes concentrações do extrato de *Vaccinium corymbosum* entre si e com os animais dos grupos controle.

Aos resultados obtidos foram empregados tratamentos estatísticos ANOVA (*Analysis of Variance*) *One Way*, para estudo das diferenças entre doses e comparações entre os grupos, associada ao teste de Tukey–Kramer para comparação múltipla (SOKAL e ROHLF, 1995; IOCHIDA e CASTRO, 2001; MARINS; DANTAS e NAVARRO, 2003; CARDOSO *et al.*, 2006 e MENDES, 2007), usando-se o GraphPad Instat[®] software (version 3.01). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Os dados da TAB.1 mostram os resultados do teste do micronúcleo obtidos em camundongos *Swiss* fêmeas e machos, tratados com as três doses do extrato de *Vaccinium corymbosum* e os respectivos controles. São apresentados os números de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) para cada animal e a média de cada grupo. A TAB. 1 também mostra a média da razão entre o número de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE), em 1.000 células analisadas por animal.

Os valores da TAB. 2 e TAB. 3 mostram os efeitos das três concentrações do extrato sobre a migração do DNA de leucócitos de sangue periférico dos camundongos *Swiss*, 4h e 24 h após a administração do extrato aos mesmos.

TABELA 1—Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) e razão de PCE/NCE observados em células do sangue periférico de camundongos Swiss fêmeas (F) e machos (M) tratados com o extrato de *Vaccinium corymbosum*, e os respectivos controles. Para cada tempo de amostra (48 e 72 h) foram analisadas 2000 células. SDM = desvio padrão da média.

Tratamento	Hora da coleta de sangue	Número de MNPCE por animal						MNPCE (Média ± SDM)	PCE/NCE (Média ± SDM)
		F ₁	F ₂	F ₃	M ₁	M ₂	M ₃		
Controle (Água)	48 h	2	1	5	3	4	6	3.5 ± 1.87	2.12 ± 0.70
	72 h	3	3	3	2	2	3	2.66 ± 0.51	2.34 ± 0.40
V. corymbosum (1000 mg/kg)	48 h	6	5	4	6	11	8	6.66* ± 2.50	1.48 ± 0.18
	72 h	6	4	5	7	6	9	6.16* ± 1.72	1.55* ± 0.21
V. corymbosum (1500 mg/kg)	48 h	8	6	7	8	10	7	7.66** ± 1.36	1.74 ± 0.17
	72 h	10	7	8	6	5	5	6.83** ± 1.94	1.75 ± 0.43
V. corymbosum (2000 mg/kg)	48 h	3	6	3	5	7	5	5.5 ± 0.83	1.99 ± 0.36
	72 h	7	9	7	6	8	6	7.16*** ± 1.16	1.98 ± 0.59
Etil-nitroso-uréia (50 mg/kg)	48 h	9	9	10	11	8	7	9.0*** ± 1.41	1.72 ± 0.31
	72 h	7	7	8	8	7	10	7.83*** ± 1.16	1.70 ± 0.23

Fonte: Laboratório de Genética – UNIFENAS, 2007.

Notas: * Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

** Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$).

*** Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$).

TABELA 2–Migração do DNA no ensaio cometa na avaliação de genotoxicidade do extrato de *Vaccinium corymbosum* em leucócitos do sangue periférico (coletados 4 h após o tratamento) de camundongos *Swiss* fêmeas (F) e machos (M) *in vivo*.

Tratamentos			Classes do cometa				Escores
	Animais	Total ¹	0	1	2	3	
Controle (Água)	F ₁	16	84	16	0	0	16
	F ₂	5	95	5	0	0	5
	F ₃	10	90	10	0	0	10
	M ₁	15	85	15	0	0	15
	M ₂	6	94	6	0	0	6
	M ₃	14	86	14	0	0	14
	Média ± SD	11.0 ± 4.73	89.0 ± 4.73	11.0 ± 4.73	0 ± 0	0 ± 0	11.0 ± 4.73
Extrato de <i>V. corymbosum</i> (1000mg/kg)	F ₁	11	89	6	5	0	16
	F ₂	6	94	4	2	0	8
	F ₃	5	95	5	0	0	5
	M ₁	19	81	15	4	0	23
	M ₂	24	76	20	4	0	28
	M ₃	12	88	10	2	0	14
	Média ± SD	12.8 ± 7.41	87.1 ± 7.41	10.0 ± 6.35	2.83 ± 1.83	0 ± 0	15.6 ± 8.73
Extrato de <i>V. corymbosum</i> (1500mg/kg)	F ₁	5	95	5	0	0	5
	F ₂	3	97	3	0	0	3
	F ₃	27	73	27	0	0	27
	M ₁	11	89	11	0	0	11
	M ₂	4	96	4	0	0	4
	M ₃	6	94	6	0	0	6
	Média ± SD	9.33 ± 9.09	90.6 ± 9.09	9.33 ± 9.0	0 ± 0	0 ± 0	9.33 ± 9.09
Extrato de <i>V. corymbosum</i> (2000mg/kg)	F ₁	1	99	1	0	0	1
	F ₂	4	96	3	1	0	5
	F ₃	8	92	7	0	1	10
	M ₁	10	90	7	2	1	14
	M ₂	5	95	5	0	0	5
	M ₃	9	91	9	0	0	9
	Média ± SD	6.16 ± 3.43	93.8 ± 3.43	5.33 ± 2.9	0.50 ± 0.83	0.33 ± 0.51	7.33 ± 4.59
Etil-nitroso-uréia (50 mg/kg)	F ₁	93	7	14	75	4	176
	F ₂	95	5	19	76	0	171
	F ₃	91	9	13	73	5	174
	M ₁	92	8	26	62	4	162
	M ₂	90	10	9	78	3	174
	M ₃	97	3	45	50	2	151
	Média ± SD	93* ± 2.6	7.0* ± 2.6	21.0* ± 13.13	69* ± 10.8	3.0* ± 1.7	168* ± 9.69

Fonte: Laboratório de Genética – UNIFENAS, 2007.

Notas: * Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$);

¹ Total de números de células com dano (classe 1+2+3).

TABELA 3—Migração do DNA no ensaio cometa na avaliação de genotoxicidade do extrato de *Vaccinium corymbosum* em leucócitos do sangue periférico (coletados 24 h após o tratamento) de camundongos *Swiss* fêmeas (F) e machos (M) *in vivo*.

Tratamentos	Animais	Total ¹	Classes do cometa				Escores
			0	1	2	3	
Controle (Água)	F ₁	5	95	5	0	0	5
	F ₂	2	98	2	0	0	2
	F ₃	5	95	5	0	0	5
	M ₁	11	89	11	0	0	11
	M ₂	1	99	1	0	0	1
	M ₃	1	99	1	0	0	1
	Média ± SD	4.16 ± 3.81	95.8 ± 3.81	4.16 ± 3.81	0 ± 0	0 ± 0	4.16 ± 3.81
Extrato de <i>V. corymbosum</i> (1000mg/kg)	F ₁	9	91	9	0	0	9
	F ₂	5	95	4	1	0	6
	F ₃	6	95	4	1	0	6
	M ₁	16	84	15	1	0	17
	M ₂	6	94	4	1	1	9
	M ₃	6	94	6	0	0	6
	Média ± SD	8.0 ± 4.14	92.1 ± 4.26	7.0 ± 4.38	0.66 ± 0.51	0.16 ± 0.4	8.83 ± 4.26
Extrato de <i>V. corymbosum</i> (1500mg/kg)	F ₁	9	91	8	1	0	10
	F ₂	8	92	7	1	0	9
	F ₃	11	89	9	1	1	14
	M ₁	9	91	8	1	0	10
	M ₂	3	97	2	1	0	4
	M ₃	6	94	5	1	0	7
	Média ± SD	7.66 ± 2.80	92.3 ± 2.80	6.5 ± 2.58	1.0 ± 0.0	0.16 ± 0.4	9.0 ± 3.34
Extrato de <i>V. corymbosum</i> (2000mg/kg)	F ₁	20	80	16	3	1	25
	F ₂	4	96	3	1	0	5
	F ₃	8	92	7	1	0	9
	M ₁	20	80	15	4	1	26
	M ₂	4	96	4	0	0	4
	M ₃	4	96	4	0	0	4
	Média ± SD	10.0 ± 7.89	90.0 ± 7.89	8.16 ± 5.84	1.5 ± 1.64	0.33 ± 0.51	12.1 ± 10.4
Etil-nitroso-uréia (50 mg/kg)	F ₁	95	5	74	15	6	122
	F ₂	88	12	67	20	1	110
	F ₃	95	5	80	10	5	115
	M ₁	95	5	74	16	5	121
	M ₂	93	7	82	8	3	107
	M ₃	95	5	91	4	0	99
	Média ± SD	93.5*±2.8	6.5* ± 2.81	78.0* ± 8.27	12.1*±5.8	3.33*±2.4	112.3* ± 8.8

Fonte: Laboratório de Genética – UNIFENAS, 2007.

Notas: * Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$);

¹Total de números de células com dano (classe 1+2+3).

7 DISCUSSÃO

O teste do micronúcleo *in vivo* para a investigação do potencial clastogênico (de causar quebras cromossômicas) e aneugênico (de causar aneuploidias) é um dos testes mais utilizados em genética toxicológica para se testar a mutagenicidade de quaisquer compostos químicos (MORITA *et al.*, 1997). O teste vem sendo utilizado por pesquisadores do mundo todo, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, utilizando células de roedores e peixes, quando *in vivo*, e diversos tipos de células, inclusive humanas, quando *in vitro* (SALAMONE *et al.*, 1980; HAYASHI *et al.*, 1999).

O teste do micronúcleo aplicado neste trabalho revelou um aumento no número médio de eritrócitos policromáticos com micronúcleo, em todas as três doses do extrato de *Vaccinium corymbosum* testadas, quando comparado com o controle negativo. Esses resultados indicam que o extrato apresentou efeito clastogênico e/ou aneugênico quando administrado oralmente aos camundongos (TAB. 1). Como era esperado, o reagente etil-nitroso-uréia, administrado intraperitonealmente como controle positivo na concentração de 50 mg/kg, acarretou um aumento significativo no número médio de células com micronúcleos ($p < 0,001$).

A TAB. 1 também mostra que o número de eritrócitos policromáticos, em relação aos normocromáticos, a cada mil células analisadas por animal, embora tenha diminuído um pouco, não diferiu estatisticamente em relação ao controle negativo. Esses dados mostram que o extrato, mesmo em doses

elevadas, não afetou a multiplicação celular dos eritrócitos e, portanto, não se mostrou citotóxico para estas células dos camundongos.

Investigações dos tipos de danos que são causados ao DNA e dos processos de reparo que ocorrem têm fornecido informações valiosas sobre os processos de envelhecimento, genética humana e câncer (SINGH *et al.* 1990). A versão alcalina do ensaio cometa, utilizando células cultivadas *in vitro*, vem sendo muito utilizada na avaliação do potencial mutagênico de compostos industriais (ROJAS; LOPEZ e VALVERDE, 1999; HARTMANN *et al.*, 2001) e também tem sido uma importante ferramenta para avaliar o potencial genotóxico de diversos compostos *in vivo* (ROJAS; LOPEZ e VALVERDE, 1999; SEKIHASHI *et al.*, 2002).

No presente trabalho, foi utilizado o ensaio cometa *in vivo*, tratando-se de um ensaio sensível, rápido e a um custo acessível. Os dados da TAB.2 e TAB.3 mostram os efeitos sobre a migração do DNA que o extrato de *Vaccinium corymbosum* produziu em leucócitos de sangue periférico de camundongos. Os dados mostram que nenhuma das três concentrações do extrato resultaram em aumento significativo de danos ao DNA destas células, em relação ao grupo controle negativo. Na maioria das células analisadas, não se observou a presença de cauda nos nucleóides (classe 0). As poucas células que sofreram danos na presença do extrato, sofreram danos pequenos (classe 1), e bem poucas células sofreram danos maiores (classes 2 e 3). Também não se observou diferença estatisticamente significativa de danos ao DNA, comparando-se as três doses do extrato testadas.

Os dados obtidos no presente estudo, utilizando o teste do micronúcleo e o ensaio cometa, foram contrastantes. A versão alcalina do ensaio cometa é

capaz de detectar quebras em uma ou nas duas fitas do DNA, assim como sítios álcali-sensíveis, bem como ligações anômalas entre DNA-DNA e DNA-proteínas. O material celular foi analisado, como recomenda o teste, 4 horas e 24 horas após o tratamento com a substância testada, e pôde-se avaliar a quantidade de danos antes (4h) e depois de ocorridos os processos de reparo dos danos ao DNA (24 h). Portanto, a vantagem geral deste ensaio é a sua sensibilidade em detectar baixos níveis de danos ao DNA (TICE *et al.*, 2000). Por outro lado, os micronúcleos, observados pelo teste do micronúcleo, normalmente são formados por fragmentos cromossômicos devido a quebras na dupla fita de DNA, e que ficam excluídos do núcleo das células filhas durante a divisão celular (SALAMONE *et al.*, 1980). Esse tipo de dano cromossômico também pode ser detectado pelo ensaio cometa. Entretanto, os micronúcleos ainda podem ser formados se cromossomos inteiros ficarem excluídos do núcleo (efeitos aneugênicos), e esse tipo de mutação dificilmente é detectado pelo ensaio cometa. Esses detalhes entre as duas metodologias utilizadas no trabalho nos permitem hipotetizar que o extrato de *Vaccinium corymbosum* possa ter apresentado algum efeito aneugênico nas células precursoras dos eritrócitos policromáticos analisados, o que explicaria o aumento de micronúcleos observado no teste do micronúcleo e a não observação de genotoxicidade no ensaio cometa.

Com relação à composição química do extrato de frutos de *Vaccinium*, os estudos têm revelado a predominância de ácidos fenólicos, tais como: gentísico, gálico, *o*-pirocatecuico, protocatecuico, salicílico, siríngico, vanílico, verátrico, caféico, *m*-coumárico, *o*-coumárico, *p*-coumárico, 3,4-imethoxicinâmico, ferrúlico, hidroxicaféico, sinápico, *p*-hidroxifenil-acético.

Adicionalmente a esses, muitas antocianinas foram identificadas, tais como: delphinidina-3-galactose, delphinidina-3-glicose, delphinidina-3-arabinose, cianidina-3-galactose, cianidina-3-glicose, petunidina-3-galactose, cianidina-3-arabinose, petunidina-3-glicose, peonidina-3-galactose, petunidina-3-arabinose, peonidina-3-glicose, malvidina-3-galactose, peonidina-3-arabinose, malvidina-3-glicose e malvidina-3-arabinose (BLUMENTHAL; GOLDBERG e BRINCKMANN, 2000; FARIA *et al.*, 2005; ZADERNOWSKI; NACZK e NESTERROWICZ, 2005). A quantificação total de compostos fenólicos e antocianinas do extrato bruto de *Vaccinium corymbosum* mostrou a presença de 5.66 ± 0.01 mg catequina/g. As antocianinas malvidina, cianidina e delphinidina foram encontradas nas concentrações de 0.131 ± 0.06 ; 0.099 ± 0.05 e 0.063 ± 0.06 mg/g de extrato, respectivamente (TORRI *et al.*, 2007, *in press*). Mesmo considerando o comprovado efeito antioxidante de antocianinas presentes neste extrato (LOHACHOOMPOL; SRZEDNICKI e CRASKE, 2004), deve-se considerar também que alguns compostos fenólicos presentes no extrato de *Vaccinium corymbosum* poderiam ser responsáveis pelos efeitos aneugênicos/clastogênicos observados neste estudo, através do teste do micronúcleo, uma vez que alguns tipos de compostos fenólicos tiveram seu potencial mutagênico descrito já há algum tempo (HUBERMAN *et al.*, 1976; SNYDER e HEDLI, 1996, entre outros). Essa idéia, apesar de coerente, precisa ser melhor investigada.

Considerando os testes e a metodologia utilizados neste trabalho, o ensaio cometa indicou que o extrato de *Vaccinium corymbosum* não induziu danos ao DNA dos leucócitos de sangue periférico dos camundongos *Swiss in vivo*. Contudo, os resultados do teste do micronúcleo indicaram que esse

mesmo extrato apresentou efeito aneugênico/clastogênico nos eritrócitos policromáticos destes animais.

O potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum* requer mais investigações e, enquanto isso não ocorre, sugere-se que seu consumo seja moderado até que o risco definitivo do mesmo sobre o genoma e, por consequência, à saúde dos seres humanos, seja melhor estabelecido.

8 CONCLUSÕES

a) Sob as condições do teste denominado “Ensaio Cometa” (SCGE), os resultados indicaram que o extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum* não induziu aumento significativo de danos ao DNA de leucócitos de sangue periférico de camundongo *Swiss*, após ensaio *in vivo*.

b) O teste do micronúcleo indicou que o extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum* apresentou efeitos aneugênicos/ clastogênicos sobre os eritrócitos policromáticos de sangue periférico dos camundongos *Swiss* albinos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNEZ-LIMA, L.F. *et al.* Processos de reparo de DNA: garantindo a estabilidade do material genético. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. cap. 3, p.49–75.
- ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos. **Rev. Nutr.**, Campinas (SP), v.13, n.2, p.81–88, maio/ago. 2000.
- BADESCU, G. *et al.* Intensive methods for blueberry propagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.10, n.165, p.189–195, abr./jun. 1985.
- BAHTEN, L.C.V. *et al.* Estudo da cicatrização nas lesões traumáticas esplênicas utilizando octil-2-cianoacrilato e fio de poliglecaprone 25. **Rev. Col. Brás. Cir.**, Rio de Janeiro (RJ), v.33, n.3, p.174–180, jun. 2006.
- BARROS, S. *et al.* Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo (SP), v.41, n.1, p.53–61, jan./mar. 2005.
- BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine: expanded commission and monographs**. Newton (USA): American Botanical Council, 2000. 519p.
- BONATO, C.P. do N.; SHARAN, C.R.; CHIUCHETTA, S.J.R. Avaliação do potencial aneuploidogênico do antineoplásico taxol exposto à linhagem diplóide de *Aspergillus nidulans*. 2006. Disponível em: <<http://www.revista.grupointegrado.br/sabios>>. Acesso em: 30 jan. 2007.

BRANDÃO, M.G.L.; FREIRE, N; VIANNA–SOARES, C.D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais: verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro (RJ), v.14, n.3, p.613–616, jul./set. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 17 de 24 de fev. 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 25 fev. 2000. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 11 jan. 2007.

BROWN, T.A. **Genética**: um enfoque molecular. 3. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 1999. 336p.

CABRITA, L.; ANDERSEN, O.M. Anthocyanins in blueberries of *Vaccinium padifolium*. **Phytochemistry**, Bergen, v.52, n.8, p.1693–1696, mar. 1999.

CAMIRE, M.E. Bilberries and blueberries as functional foods and nutraceuticals. In: MAZZA, G.; OOMAH, B.D. (Eds). **Functional Foods**: Herbs, Botanicals and Teas. Lancaster: Technomic Publishing, 2000. cap.5, p.289–319.

CARDOSO, P. de C. *et al.* Influência de tratamento de superfície na resistência adesiva de compósito nanoparticulado. **Cienc. Odontol. Brás.**, Florianópolis (SC), v.9, n.2, p.83–88, abr./jun. 2006.

COLÉGIO Brasileiro de Experimentação Animal. Disponível em: <<http://www.cobea.org>>. Acesso em: 20 jan. 2007.

DELMANTO, R.D. *et al.* Avaliação do efeito protetor de chás de cogumelo *Agaricus blazei* Murill contra a genotoxicidade da ciclofosfamida e do n–etil–n–nitrosuréia. **Genetics and Molecular Biology**, Uberlândia (MG), v.23, p.697, fev. 2000. Supplement.

EHLENFELDT, M.K.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Maryland (USA), v.49, p.2222–2227, may 2001.

ESPÓSITO, A.V. *et al.* Evaluation of the genotoxic potential of the *Hypericum brasiliense* (Guttiferae) extract in mammalian cell system *in vivo*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto (SP) Brazil, v.28, n.1, p.152–155, 2005.

FARBAIN, D.W.; OLIVE, P.L.; O' NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v.339, n.15, p.37–59, mar. 1995.

FARIA, A. *et al.* Antioxidant properties of prepared Blueberry (*Vaccinium myrtilus*) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Salamanca (Spain), v.53, n.17, p. 6896–6902, jul. 23, 2005.

GIRI, S. *et al.* Genotoxic effects of Malathion in chick *in vivo* micronucleus assay. **Cytologia**, Japan Mendel Society, Tokyo (Japan), v.67, n.1, p.53–59, 2002.

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

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

GRIFFITHS, A.J.F. *et al.* **Introdução à Genética**. 7. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2002. 794p.

HARTMANN, A. *et al.* Use of the alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.**, Switzerland, v.39, n.8, p.103–118, aug. 2001.

HARTMANN, A; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicol. Lett.**, Germany, v.90, n.2–3, p.183–188, feb. 1997.

- HAYASHI, M. *et al.* The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, Tokyo/Japan, v.245, n.4, p.245–249, dec. 1999.
- HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. **Mutation Research**, v.18, p.187–190, 1973.
- HOFFMANN, A.M. Aspectos gerais da cultura. Artigos Técnicos. Disponível em: <<http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/artigos/mirtilo.html>>. Acesso em: 02 nov. 2005.
- HOFFMANN, A.M.; FACHINELLO, J.C.; SANTOS, A.M. dos. Propagação de Mirtilo (*Vaccinium asheil Reade*) através de estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília (DF), v.30, n.2, p.231–236, fev. 1995.
- HOYOS, L.S. *et al.* Evaluation of the genotoxic effects of a folk medicine, *Petiveria alliacea* (anamu). **Mutation Research**, Colombia, v.280, n.1, p.29–34, jul. 1992.
- HUBERMAN, E. *et al.* Identification of mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.73, n.2, p.607–611, feb. 1976.
- IOCHIDA, L.C.; CASTRO, A.A. Projeto de Pesquisa (Parte VII – Método Estatístico/Análise Estatística). In: CASTRO, A.A. **Planejamento da Pesquisa**. São Paulo, 2001. p.1–15. Disponível em: <<http://www.metodologia.org>>. Acesso em: 06 jan. 2007.
- KATSUBE, N. *et al.* Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Japan, v.51, n.1, p.68–75, nov. 2003.
- KLAUDE, M. *et al.* The comet assay: Mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, Sweden, v.363, n.2, p.89–96, jun. 1996.

LOHACHOOMPOL, V; SRZEDNICKI, G.; CRASKE, J. The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. **Journal Biomedicine and Biotechnology**, Sydney (Austrália), v.5, p.248–252, jun. 2004.

MAISTRO, E.L. *et al.* *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto (SP) Brazil, v.28, n.4, p.833–838, oct./dec. 2005.

MARINS, J.C.B.; DANTAS, E.; NAVARRO, S.Z. Diferentes tipos de hidratação durante o exercício prolongado e sua influência sobre o sódio plasmático. **Rev. Bras. Ciênc. Mov.**, Brasília (DF), v.11, n.1, p.13–21, jan. 2003.

MATCHETT, M.D. *et al.* Blueberry flavonoids inhibit matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells. **Biochem. Cell Biol.**, USA, v.83, n.5, p.637–643, oct. 2005.

MAVOURNIN, K.H. *et al.* The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene–Tox Program. **Mutation Research**, v.239, n.1, p.29–80, jun. 1990.

MAZZA, G. *et al.* Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Canadá, v.50, n.26, p.7731–7737, nov. 2002.

MENDES, B.A. Métodos Estatísticos. Disponível em:
<<http://www.uac.pt/~amendes/mestrado/regrMultvResd.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2007.

MORITA, T. *et al.* Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Group 1. 2A and 2B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. **Mutation Research**, Amsterdam, v.389, n.1, p.122–128, jul. 1997.

MOTTER, M.D.S. *et al.* Índice mitótico em células epiteliais da brânquia de Guaru (*Poecilia vivipara*) tratados com frações da casca do caule e da folha de Pequi (*Caryocar brasiliensis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo (SP), v.41, n.4, p.221–227, jul./ago. 2004.

MOYER, R.A. *et al.* Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.519–525, 2002.

OPPENHEIM, J.J.; FISHBEIN, W. Induction of chromossome breaks in cultured normal human leukocytes by potassium arsenite, hydroxyurea and related compounds. **Câncer Research**, v.25, n.7, p.980–985, aug. 1965.

PACHECO, A. de O.; HACKEL, C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro (RJ), v.18, n.6, p.1675–1683, nov./dez. 2002.

PASSOS, L.A.C.; LIMA FILHO, A.F.; MENCARELLI, J.R. de J. Auto-suficiência na produção de maravalha utilizada na criação de animais de laboratório. 2007. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/artigo1.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2007.

PEITL JÚNIOR, P.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; CÓLUS, I.M.S. Genotoxic activity of the insecticide Nuvacron (Monocrotophos) detected by the micronucleous test in bone marrow erythrocytes of mice and CHO cells. **Braz. J. Genet.**, Ribeirão Preto (SP) Brazil, v.19, n.4, p.571–576, aug. 1996.

PIPERAKIS, S.M.; VISCARDIS, E.E.; TASSIOU, A.M. Comet assay for nuclear DNA damage. In: SIMON, M.; PACKER, L. **Methods in Enzimology**. New York: Academic Press, 1999. p.184–194. v.300.

PRIOR, R.L. *et al.* Antioxidant capacity is influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, USA, v.46, n.7, p.2686–2693, jun. 1998.

RABELLO–GAY, M.N. Teste de micronúcleo em medula óssea. In: RABELLO–GAY, M.N.; RODRÍGUEZ, M.A.L.R.; MONTELEONE–NETO, R. (Eds). **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação.** Ribeirão Preto (SP): Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 1991. p.83–90.

RABELLO–GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE–NETO, R. **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação.** Ribeirão Preto (SP): Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira de Genética, 1991. 112p.

RAMPAZO, L.G.L. *et al.* Chlorophyllin antimutagenesis mechanisms under different treatment conditions in the micronucleous assay in V79 cells. **Cytologia**, Tokyo (Japan), v.67, n.3, p.323–327, jul. 2002.

RIBEIRO, D.A.; MARQUES, M.E.A.; SALVADORI, D.M.F. Study of DNA damage induced by dental bleaching agents *in vitro*. **Braz. Oral Res.**, Botucatu (SP) Brazil, v.20, n.1, p.47–51, mar. 2006.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental.** Canoas: ULBRA, 2003. cap.7, p.173–198.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental.** Canoas: ULBRA, 2003, p.21–27.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental.** 1ª ed. Canoas: ULBRA, 2003. cap.7, 356 p.

ROJAS, E., LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal Chromatography B.** México, v.722, n.1–2, p.225–254, feb. 1999.

SALAMONE, M. *et al.* Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. **Mutation Research**, v.74, n.5, p.347–356, oct. 1980.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. cap.8, p.201–223.

SALZANO, F.M. Saúde pública no primeiro e terceiro mundos: desafios e perspectivas. **Ciências & Saúde Coletiva**, Porto Alegre (RS), v.7, n.1, p.7–16, out. 2002.

SCHER, R. *et al.* Avaliação do potencial genotóxico do Saião (*Kalanchoe brasiliensis*) em eritrócitos policromáticos de camundongos. **Genetics and Molecular Biology**, Supplement, Ribeirão Preto (SP): Sociedade Brasileira de Genética, v.23, p.696–697, 2000.

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

SCHNAIDER, T.B.; SOUZA, C. de. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Belo Horizonte (MG), v.53, n.2, p.278–285, mar./abr. 2003.

SEKIHASHI, K. *et al.* Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. **Mutation Research**, Japan, v.517, n.1–2, p.53–74, may 2002.

SILVA, J. da *et al.* An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo (SP), v.23, n.1, p.241–245, mar. 2000.

SINGH, N.P. *et al.* A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. **Mutation Research**, Cheney, v.252, n.3, p.289–296, jun. 1991.

SINGH, N.P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, Baltimore, v.175, n.1, p.184–191, mar. 1988.

SINGH, N. P. *et al.* DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. **Mutation Research**, Baltimore, v.237, n.3–4, p.123–130, may/jul. 1990.

SÍTIO Canto do Sabiá. Disponível em: <<http://www.mirtilor.com.br>>. Acesso em: 31 jan. 2007.

SNYDER, R.; HEDLI, C.C. An overview of benzene metabolism. **Environ Health Perspect.**, New Jersey, v.104, supplement 6, p.1165–1171, dec. 1996.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The principles and practice of statistics in biology research. In: FREEMAN, W.H. (Ed.). **Biometry**. 3. ed. San Francisco, 1995, p.175–205, 404–486.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single–cell gel test). In: HENDERSON, D.S. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. v.113. Totowa: Humana Press Inc., 1999, p. 203–212.

SURH, Y.; FERGUSON, L.R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential—highlights of a symposium. **Mutation Research**, v.523/524, p.1–8, feb./mar. 2003.

TAKAHASHI, C.S. Testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidia. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. 356p.

TICE, R.R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v.35, n.3, p.206–221, jun. 2000.

TICE, R.R., STRAUS, G.H.S.; PETERS, W.P. The single cell gel electrophoresis/comet assay. A potential tool for detecting radiation–induced DNA damage in human. **Mutation Research**, v.271, n.13, p.101–114, 1992.

TOLEDO, A.C.O. *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista (SP), v.21, n.1/2, p.7–13, jan./dez. 2003.

TORRI, E. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive properties of blueberry extract (*Vaccinium corymbosum*). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2007.

VACCINIUM myrtillus (Bilberry). **Alternative Medicine Review**, v.6, n.5, p.500–504, jul. 2001.

VAGHEF, H. *et al.* Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. **Mutation Research**, v.395, p.127–138, 1997.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Boston, v.45, n.2, p.304–309, nov. 1997.

WEISBURGER, J.H.. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutation Research**, v.437, n.16, p.105–112, 1999.

YOUDIM, K.A. *et al.* Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. **Journal Nutr. Biochem.**, v.13, n.5, p.282–288, 2002.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTERROWICZ, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Canadá, v.53, n.6, p.2118–2124, feb. 2005.

ZAMBRANO, M.A.; TARGA, H.J.; RABELLO–GAY, M.N.. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleous and metaphase slide preparations. **Stain Technology**, v.57, n.1, p.48–49, jan. 1982.

ZANONI, F.D. *et al.* Clastogenicity of the *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) bark wood extract in wistar rat bone marrow cells. **Cytologia**, Japan, v.70, n.3, p.303–308, 2005.

**10 ANEXO – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA
UNIFENAS**



DECLARAÇÃO

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP, da UNIFENAS, constituído de conformidade com a Portaria nº 32, de 19 de abril de 2001, da Reitoria, e nos termos da Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, declara que **Patrícia Scotini Freitas** aluna do Mestrado em Saúde apresentou o relatório final referente ao projeto de pesquisa **INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO EXTRATO DE FRUTOS DE VACCINIUM CORYMBOSUM EM CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS SWISS IN VIVO**, cujo protocolo, nº 03 A/2005, fora aprovado por este Comitê na data de 08/03/2006.

Alfenas, 19 de março de 2007

Profª Helena Engel Velano
Coordenadora do CEP

11 APÊNDICE

ARTIGO RESULTANTE

***In vivo* evaluation of the mutagenic potential of *Vaccinium corymbosum* (blueberry) extract on peripheral blood cells of Swiss mice**

Patrícia Scotini Freitas*, Sérgio Faloni de Andrade** and Edson Luis Maistro***

* Universidade José do Rosário Vellano–UNIFENAS – Faculdade de Enfermagem, campus Poços de Caldas, Minas Gerais, Brazil. 37700-970.

** Universidade do Oeste de Santa Catarina, campus Videira, Santa Catarina, Brazil. 89560-000.

***Universidade Estadual Paulista–UNESP – Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia, campus Marília, São Paulo, Brazil. 17525-900.

RUNNING HEAD: Mutagenic evaluation of *Vaccinium corymbosum*.

KEY WORDS: *Vaccinium corymbosum*, micronuclei, comet assay, mutagenicity tests.

***Corresponding author: Dr. Edson Luis Maistro, Universidade Estadual Paulista–UNESP, Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia. Av. Hygino Muzzi Filho, 737, Caixa Postal 181. Marília, SP, Brazil. 17525-900.

E-mail address: edson.maistro@marilia.unesp.br

Abstract

Blueberry *Vaccinium corymbosum* is a plant which is very rich in anthocyanins which have strong antioxidant capacity and other potential health benefits, owing to which they are widely consumed around the world as medicinal plant. In this work, the mutagenic potential of the crude extract from this plant was studied in mice, following acute treatment using the comet (SCGE) and micronucleus (MN) assays. Animals were treated orally with three different concentrations of the extract (1000, 1500 and 2000 mg/kg). Peripheral blood cells of Swiss mice were collected 4 and 24 h after the treatment for the SCGE assay, and 48 and 72 h for the micronucleus test. The results show that the extract of *V. corymbosum* did not induce any statistically significant increases in the average amount of DNA damage in the peripheral blood leukocytes. However, a significant increase in mean of the micronucleated polychromatic erythrocytes was observed at three tested doses. It is suggested that its consumption be moderated until the risk to humans is definitively established.

Introduction

The medicinal use of plants is as old as humankind itself. More than 150000 plant species have been studied, and many of which contain therapeutic substances (Hoyos *et al.*, 1992; Surh and Ferguson, 2003). These substances can be extracted and used in the preparation of drugs, or the plant itself can be used directly as a medication, a practice that is particularly popular in developing countries. Since many of these plants contain compounds which are known to cause diseases or even death in animals and humans, there is considerable interest in determining the risks that these products may pose to health.

The genus *Vaccinium*, of the family Ericaceae, comprises about 200 species. Some of these species have edible fruits of economic importance. In recent decades interest in the anthocyanin content of some *Vaccinium* species has revived due to their pharmacological properties, e.g. bioactive properties, such as antioxidant activity (Wang *et al.*, 1997; Mazza *et al.*, 2002; Lohachoompol *et al.*, 2004), anti-inflammatory (Youdin *et al.*, 2002), cardiovascular protection, antidiabetic properties, vision improvement properties, and inhibition of carcinogenesis (Cabrita and Andersen, 1999; Camire, 2000; Katsube *et al.*, 2003). Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) are economically important woody plants, and the fruits contain high amounts of antioxidants which are beneficial to health (Prior *et al.*, 1998; Ehlenfeldt and Prior, 2001).

In this study, three different concentrations of a crude hydroalcoholic extract of the fruits of *Vaccinium corymbosum* were tested for acute mutagenicity *in vivo* in Swiss mice peripheral blood cells, using the single cell gel electrophoresis (SCGE) and micronucleus tests.

Material and Methods

Plant material

Berries of the blueberry (*Vaccinium corymbosum*) plant were collected in the experimental field of the company “Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural”, in the State of Santa Catarina (EPAGRI), Videira, in 2005. The berries were picked at the commercially ripe stage. All damaged, diseased, or pest-infested fruits, stems and leaves were removed. The berries were kept in polyethylene bags at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until extract preparation. Prior to extraction, the frozen berries were crushed using a food processor. The crushed berries (1.0 kg) were macerated with aqueous ethanol 70% (v/v) at room temperature for seven days. The crude extract was obtained by filtration, followed by concentration under reduced pressure, to yield 138.0 g (13.8% w/w).

Chemicals

The agent N-nitroso-N-ethylurea (ENU, CAS N°. 759-73-9) was used as the DNA damaging agent in the SCGE and micronucleus assays using Swiss mice. It was dissolved in phosphate-buffer at pH 6. The other principal chemicals used were obtained from the following suppliers: normal melting point (NMP) agarose (Cat. N°. 15510-019: Invitrogen); Low melting point (LMP) agarose (Cat. N°. 15517-014: Invitrogen); Sodium salt *N*-lauroyl sarcosine (L-5125: Sigma) and Ethylenediaminetetraacetic acid EDTA (Merck).

Animals and assay procedures

Experiments were carried out on 12-week old Swiss mice (*Mus musculus*) weighing 25–30 g. The animals were acquired from the animal house of the Jose do Rosario Vellano University (UNIFENAS), and kept in polyethylene boxes ($n = 6$), in a climate-controlled environment ($25 \pm 4^{\circ}\text{C}$, $52 \pm 5\%$ humidity) with a 12h, light/dark cycle (7 a.m. to 7 p.m.). Food (LABINA-PURINA) and water were available *ad libitum*. The mice were divided into experimental groups of six animals each, three females and three males. *Vaccinium corymbosum* extract was administered at a single dose of 0.5ml by gavage, at concentrations of 1000, 1500 and 2000 mg/kg body weight, selected on the basis of our acute toxicity studies in mice, which was higher than 2000 mg/kg. The negative control group received distilled water. The positive control group received 50 mg of N-nitroso-N-ethylurea/kg. The single cell gel electrophoresis test (SCGE) was carried out using the method described by Speit and Hartmann (1999), which is based on the original work of Singh *et al.* (1988) and includes modifications introduced by Klaude *et al.* (1996) as well as some additional modifications. Four, and twenty-four hours after the treatment, peripheral blood leukocytes from Swiss mice were taken. A 10 μl aliquot of the blood cells from each animal was mixed with 120 μl of 0.5% low melting point agarose at 37°C , and rapidly spread on microscope slides pre-coated with 1.5% normal melting point agarose. Coverslips were added and the slides were allowed to gel at 4°C , for 20 min. The coverslips were gently removed and the slides were then immersed in cold, freshly prepared lysing solution consisting of 89 ml of a stock solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH set to 10.0 with ~8g solid NaOH, 890 ml of distilled water and 1% sodium lauryl sarcosine), plus 1 ml of Triton X-100 (Merck) and 10 ml of DMSO. Protected from light,

the slides were left to stand at 4°C for 1 h and then placed in the gel box, positioned at the anode end, and left in a high pH (>13) electrophoresis buffer (300 mM NaOH per 1 mM EDTA, prepared from a stock solution of 10 N NaOH and 200 mM, pH 10.0, EDTA) at 4°C for 20 min before electrophoresis to allow the DNA to unwind. The electrophoresis run was performed in an ice bath (4°C) for 20 min at 25 V and 300 mA. The slides were then submerged in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature and fixed in 100% ethyl alcohol for 10 min. The slides were dried and stored at least overnight before staining. For the staining process, the slides were covered with 30 µl of 1x ethidium bromide staining solution prepared from a 10x stock (200µg/ml), and covered with a coverslip. The material was evaluated immediately at 400x magnification, using a fluorescence microscope (Nikon) with a 515–560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter. For the micronucleus (MN) assay, peripheral blood from the same animals used in the SCGE procedure was collected from the orbital vein, 48 and 72 h after the treatment, then blood smear slides were prepared. All the slides were coded, fixed with methanol, and stained with Giemsa solution. For the micronucleus (MN) presence, four thousand polychromatic erythrocytes were scored from each Swiss mouse (2000 cells from 48 h blood sample and 2000 cells from 72 h blood sample). One thousand cells were analyzed per animal, to determine the polychromatic:normochromatic erythrocyte ratio. All the animals were submitted to euthanasia 72 h after the blood sample collection. The Animal Bioethical Committee of UNIFENAS, Brazil, approved the present study (protocol number 03A/2006), in accordance with the Federal Government legislation on animal care.

Scoring procedures and data evaluation

The extent and distribution of DNA damage indicated by the SCGE assay was evaluated by examining at least 100 randomly selected and non-overlapping cells on the slides, per animal. These cells were scored visually, according to tail size, into four classes, as follows: (1) class 0: undamaged, with no tail; (2) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with a tail length 1 to 2x the diameter of the head; and (4) class 3: with a tail longer than 2x the diameter of the head. Comets with no heads and images with nearly all DNA in the tail, or with a very wide tail, were excluded from evaluation because they probably represent dead cells (Hartmann and Speit, 1997). The total score for 100 comets was obtained by multiplying the number of cells in each class by the damage class, ranging from 0 (all undamaged) to 300 (all maximally damaged).

Statistical Analysis

The data obtained on micronucleus and SCGE assays were submitted to One-way analysis of variance test (ANOVA) and the Tukey–Kramer multiple comparison test (Sokal and Rohlf, 1995), using the GraphPad Instat[®] software (version 3.01). The results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Table 1 shows the micronucleus test results obtained for female and male Swiss mice treated with *V. corymbosum* extract: the number of micronucleated polychromatic

erythrocytes (MNPCE) per animal, and the means, for the untreated controls and treated animals. The micronucleus assay in rodents is the best-documented *in vivo* test on clastogenic effects (chromosome aberrations), in relation to the number of tested chemicals (Morita *et al.*, 1997). The mutagenicity test revealed enhancement in the mean number of micronucleated polychromatic erythrocytes at all the tested doses. As expected, N-nitroso-N-ethylurea administered intraperitoneally as positive control at 50 mg/kg showed a significant increase in the mean number of micronuclei ($p < 0.001$).

Table 1 also shows the ratio between the mean number of polychromatic erythrocytes (PCE), in relation to normochromatic erythrocytes (NCE) on 1.000 randomly cells analyzed from each animal. The PCE/NCE ratio showed a slight decrease but this was not significant at any of the tested doses indicating that the *V. corymbosum* extract does not present cytotoxic properties regarding erythropoiesis.

Investigations into the nature of DNA damage and repair have provided valuable insights into aging, human genetics and cancer (Singh *et al.* 1990). The alkaline Comet assay (SCGE) is increasingly used in industrial genotoxicity testing *in vitro* (Rojas *et al.* 1999, Hartmann *et al.* 2001) and has also been used as an important tool to evaluate the genotoxic potential of compounds *in vivo* (Rojas *et al.* 1999, Sekihashi *et al.* 2002).

Tables 2 and 3 show the effects of a 4 h and 24 h treatment with the extract on DNA migration in peripheral blood leukocytes from Swiss mice on the comet assay, respectively. As expected, N-nitroso-N-ethylurea agent used as positive control led to some fragmentation and migration of the fragments in the SCGE assay peripheral blood cells. No significant effects on DNA migration were found at the three *V. corymbosum* extract concentrations tested in leukocytes. When exposed to the test extract, most cells examined on the slides were undamaged (class 0), a few cells showed minor damage (class 1) and a

very few showed a large amount of damage (class 2 and 3). Furthermore, there was no significant difference in DNA migration among the three extract concentrations tested (Tables 2 and 3).

The data obtained in the present study using the micronucleus and SCGE assays showed contrasting results. The pH > 13 version of SCGE is capable of detecting DNA double and single-strand breaks, alkali-labile sites, DNA-DNA/DNA-protein cross-linking, and single-strand breaks associated with incomplete excision repair sites. The general advantage of this assay is its sensitivity for detecting low levels of DNA damage (Tice *et al.*, 2000). On the other hand, the micronuclei observed in the micronucleus test usually arises from loss of chromosomal fragments during the division of the nucleated precursor cells (Salamone *et al.*, 1980). This type of chromosome damage can also normally be detected by the SCGE assay. However, micronuclei may also be formed if whole chromosomes are lost, and this type of mutation is difficult to detect by the SCGE. The results of this technique enable us to suggest that *V. corymbosum* extract could contain some aneugenic or clastogenic effect on precursors cells of erythrocytes, as evidenced by the micronucleus test.

From a phytochemical point of view, studies carried out with berries of *Vaccinium* have demonstrated the presence mainly of phenolic acid compounds, such as: gentisic, gallic, *o*-pyrocatechuic, protocatechuic, salicylic, syringic, vanillic, veratric, caffeic, *m*-coumaric, *o*-coumaric, *p*-coumaric, 3,4-dimethoxycinnamic, ferulic, hydroxycaffeic, sinapic, *p*-hydroxyphenil-acetic. In addition, many anthocyanin compounds were identified, such as: delphinidin-3-galactose, delphinidin-3-glucose, delphinidin-3-arabinose, cyanidin-3-galactose, cyanidin-3-glucose, petunidin-3-galactose, cyanidin-3-arabinose, petunidin-3-glucose, peonidin-3-galactose, petunidin-3-arabinose, peonidin-3-

glucose, malvidin-3-galactose, peonidin-3-arabinose, malvidin-3-glucose and malvidin-3-arabinose (Blumenthal *et al.*, 2000; Faria *et al.*, 2005; Zadernowski *et al.*, 2005). Quantification of total phenolics and anthocyanins of the *V. corymbosum* crude extract showed that the total concentration of phenolic compounds in extract was 5.66 ± 0.01 mg catequin/g. Anthocyanins malvidin, cyanidin and delphinidin presented concentration in extract of 0.131 ± 0.06 ; 0.099 ± 0.05 and 0.063 ± 0.06 mg/g of extract, respectively (Torri *et al.*, 2007, *in press*). Despite the proven antioxidant effect of these anthocyanins (Lohachoompol *et al.*, 2004), some phenolic compound could be responsible for the clastogenic/aneugenic effect observed in the present study, since the mutagenic potential of some phenolic compounds has been described for a long time (Huberman *et al.*, 1976; Snyder and Hedli, 1996, among others). This idea needs to be further investigated.

Under the test conditions, the SCGE test indicates that *V. corymbosum* extract did not induce DNA damage in peripheral blood cells of Swiss mice *in vivo*, but the micronucleus test indicates that the extract presented clastogenic/aneugenic effects in these cells. Therefore, although the doses used in this study are at least three times higher than those used in pharmacological assays carried out with *Vaccinium* extracts (Torri *et al.*, 2007, *in press*), other potential mutagenic effects of this extract require further investigation, and it is suggested that its consumption be moderated until the risk for humans is definitively established.

Acknowledgments

We would like to thank the Brazilian agencies CNPq, FAPESP and FAPEMIG (Rede Mineira de Ensaios Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos, EDT-1879/02) for their financial support of this study and Lucimara Maria da Silva for her technical assistance.

References

- Blumenthal M, Goldberg A and Brinckmann J (2000) Herbal Medicine—expanded commission E monographs. American Botanical Council, Newton, M.A., USA, p .519.
- Cabrita L and Andersen OM (1999) Anthocyanins in blue berries of *Vaccinium padifolium*. *Phytochemistry* 52:1693–1696.
- Camire ME (2000) Bilberries and blueberries as functional foods and nutraceuticals. In: Mazza G and Oomah BD eds. *Functional Foods: Herbs, Botanicals and Teas*. Lancaster: Technomic Publishing, 289–319.
- Ehlenfeldt MK and Prior RL (2001) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *J Agric Food Chem* 49:2222–2227.
- Faria A, Oliveira J, Neves P, Gameiro P, Santos-Buelga C, Freitas V and Mateus N (2005) Antioxidant properties of prepared Blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *J Agric Food Chem* 53: 6896–6902.

- Hartmann A and Speit G (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett* 90:183–188.
- Hartmann A, Elhajouji A, Kiskinis E, Poetter F, Martus HJ, Fjallman A, Frieauff W and Suter W (2001) Use of the alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 39:103–118.
- Huberman E, Sachs L, Yang SK and Gelboin V (1976) Identification of mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 73(2):607–611.
- Hoyos LS, Au WW, Heo MY, Morris DL and Legator MS (1992) Evaluation of the genotoxic effects of a folk medicine, *Petiveria alliacea* (anamu). *Mutat Res* 280:29–34.
- Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Yamaki K and Kobori M (2003) Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem* 51:68–75.
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J and Ahnström G (1996) The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 363:89–96.
- Lohachoompol V, Srzednicki G and Craske J (2004) The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *J Biomed Biotech* 5:248–252.
- Mazza G, Kay CD, Cottrell T and Holub BJ (2002) Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J Agric Food Chem* 50:7731–7737.

- Morita T, Asano N, Awogi T, Sasaki YF, Sato S, Shimada H, Sutou S, Suzuli T, Wakata A, Sofuni T and Hayashi M (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Group 1. 2A and 2B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. *Mutat Res* 389:3–122.
- Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G and Mailand M (1998) Antioxidant capacity is influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J Agric Food Chem* 46:2686–2693.
- Rojas E, Lopez MC and Valverde M (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatography B* 722:225–254.
- Salamone M, Heddle J, Stuart E and Katz M (1980) Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat Res* 74:347–356.
- Sekihashi K, Yamamoto A, Matsumura Y, Ueno S, Watanabe-Akanuma M, Kassie F, Knasmuller S, Tsuda S and Sasaki YF (2002) Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutat. Res.* 517:53–74.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, and Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191.
- Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L and Schneider EL (1990) DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res* 237:123–130.

- Snyder R and Hedli CC (1996) An overview of benzene metabolism. *Environ Health Perspect.* 104:1165–1171.
- Sokal RR and Rohlf FJ (1995) In: W.H. Freeman (Ed.), *Biometry*. San Francisco, pp. 175–205; 404–486.
- Speit G and Hartmann A (1999) The comet assay (single-cell gel test), in: Henderson, D.S. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 113, *DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 203–212.
- Surh Y and Ferguson LR (2003) Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential—highlights of a symposium. *Mutat Res* 523–524:1–8.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi, H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC and Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:206–221.
- Torri E, Lemos M, Caliaro V, Kassuya CAL, Bastos JK and Andrade SF (2007) Anti-inflammatory and antinociceptive properties of blueberry extract (*Vaccinium corymbosum*). *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (*in press*).
- Wang H, Cao G and Prior RL (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem* 45(2):304–309.
- Youdim KA, McDonald J, Kalt W and Joseph JA (2002) Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *J. Nutr. Biochem.* 13:282–288.

Zadernowski R, Naczek M and Nesterowicz J (2005) Phenolic acid profiles in some small berries. *J Agric Food Chem* 53: 2118–2124.

Table 1–Number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) and PCE/NCE ratio observed in the peripheral blood cells of female (F) and male (M) Swiss mice treated with a *Vaccinium corymbosum* extract, and respective controls. For each time period (48 and 72 h) 2000 cells were analyzed. SDM = standard deviation of the mean.

Treatments	Blood collect time	Number of MNPCE per animal						MNPCE (Mean ± SDM)	PCE/NCE (Mean ± SDM)
		F ₁	F ₂	F ₃	M ₁	M ₂	M ₃		
Control (Water)	48 h	2	1	5	3	4	6	3.5 ± 1.87	2.12 ± 0.70
	72 h	3	3	3	2	2	3	2.66 ± 0.51	2.34 ± 0.40
<i>V. corymbosum</i> (1000 mg/kg)	48 h	6	5	4	6	11	8	6.66* ± 2.50	1.48 ± 0.18
	72 h	6	4	5	7	6	9	6.16* ± 1.72	1.55* ± 0.21
<i>V. corymbosum</i> (1500 mg/kg)	48 h	8	6	7	8	10	7	7.66** ± 1.36	1.74 ± 0.17
	72 h	10	7	8	6	5	5	6.83** ± 1.94	1.75 ± 0.43
<i>V. corymbosum</i> (2000 mg/kg)	48 h	3	6	3	5	7	5	5.5 ± 0.83	1.99 ± 0.36
	72 h	7	9	7	6	8	6	7.16*** ± 1.16	1.98 ± 0.59
N-Nitroso-N-Ethylurea (50 mg/kg)	48 h	9	9	10	11	8	7	9.0*** ± 1.41	1.72 ± 0.31
	72 h	7	7	8	8	7	10	7.83*** ± 1.16	1.70 ± 0.23

* Significantly different from negative control (p < 0.05).

** Significantly different from negative control (p < 0.01).

*** Significantly different from negative control (p < 0.001).

Table 2–DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Vaccinium corymbosum* extract in peripheral blood leukocytes (collected 4 h after the treatment) from Swiss mice female (F) and male (M) *in vivo*.

Treatments	Comet class						Scores
	Animals	Total ¹	0	1	2	3	
Control (Water)	F ₁	16	84	16	0	0	16
	F ₂	5	95	5	0	0	5
	F ₃	10	90	10	0	0	10
	M ₁	15	85	15	0	0	15
	M ₂	6	94	6	0	0	6
	M ₃	14	86	14	0	0	14
	Mean ± SD	11.0 ± 4.73	89.0 ± 4.73	11.0 ± 4.73	0 ± 0	0 ± 0	11.0 ± 4.73
<i>V. corymbosum</i> extract 1000mg/kg	F ₁	11	89	6	5	0	16
	F ₂	6	94	4	2	0	8
	F ₃	5	95	5	0	0	5
	M ₁	19	81	15	4	0	23
	M ₂	24	76	20	4	0	28
	M ₃	12	88	10	2	0	14
	Mean ± SD	12.8 ± 7.41	87.1 ± 7.41	10.0 ± 6.35	2.83 ± 1.83	0 ± 0	15.6 ± 8.73
<i>V. corymbosum</i> extract 1500mg/kg	F ₁	5	95	5	0	0	5
	F ₂	3	97	3	0	0	3
	F ₃	27	73	27	0	0	27
	M ₁	11	89	11	0	0	11
	M ₂	4	96	4	0	0	4
	M ₃	6	94	6	0	0	6
	Mean ± SD	9.33 ± 9.09	90.6 ± 9.09	9.33 ± 9.0	0 ± 0	0 ± 0	9.33 ± 9.09
<i>V. corymbosum</i> extract 2000mg/kg	F ₁	1	99	1	0	0	1
	F ₂	4	96	3	1	0	5
	F ₃	8	92	7	0	1	10
	M ₁	10	90	7	2	1	14
	M ₂	5	95	5	0	0	5
	M ₃	9	91	9	0	0	9
	Mean ± SD	6.16 ± 3.43	93.8 ± 3.43	5.33 ± 2.9	0.50 ± 0.83	0.33 ± 0.51	7.33 ± 4.59
N-Nitroso-N-Ethylurea (50 mg/kg)	F ₁	93	7	14	75	4	176
	F ₂	95	5	19	76	0	171
	F ₃	91	9	13	73	5	174
	M ₁	92	8	26	62	4	162
	M ₂	90	10	9	78	3	174
	M ₃	97	3	45	50	2	151
	Mean ± SD	93* ± 2.6	7.0* ± 2.6	21.0* ± 13.13	69* ± 10.8	3.0* ± 1.7	168* ± 9.69

* Significantly different from the negative control ($p < 0.001$).

¹Total number of damaged cells (class 1+2+3).

Table 3–DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Vaccinium corymbosum* extract in peripheral blood leukocytes (collected 24 h after the treatment) from Swiss mice female (F) and male (M) *in vivo*.

Treatments	Comet class						Scores
	Animals	Total ¹	0	1	2	3	
Control (Water)	F ₁	5	95	5	0	0	5
	F ₂	2	98	2	0	0	2
	F ₃	5	95	5	0	0	5
	M ₁	11	89	11	0	0	11
	M ₂	1	99	1	0	0	1
	M ₃	1	99	1	0	0	1
	Mean ± SD	4.16 ± 3.81	95.8 ± 3.81	4.16 ± 3.81	0 ± 0	0 ± 0	4.16 ± 3.81
<i>V. corymbosum</i> extract 1000mg/kg	F ₁	9	91	9	0	0	9
	F ₂	5	95	4	1	0	6
	F ₃	6	95	4	1	0	6
	M ₁	16	84	15	1	0	17
	M ₂	6	94	4	1	1	9
	M ₃	6	94	6	0	0	6
	Mean ± SD	8.0 ± 4.14	92.1 ± 4.26	7.0 ± 4.38	0.66 ± 0.51	0.16 ± 0.4	8.83 ± 4.26
<i>V. corymbosum</i> extract 1500mg/kg	F ₁	9	91	8	1	0	10
	F ₂	8	92	7	1	0	9
	F ₃	11	89	9	1	1	14
	M ₁	9	91	8	1	0	10
	M ₂	3	97	2	1	0	4
	M ₃	6	94	5	1	0	7
	Mean ± SD	7.66 ± 2.80	92.3 ± 2.80	6.5 ± 2.58	1.0 ± 0.0	0.16 ± 0.4	9.0 ± 3.34
<i>V. corymbosum</i> extract 2000mg/kg	F ₁	20	80	16	3	1	25
	F ₂	4	96	3	1	0	5
	F ₃	8	92	7	1	0	9
	M ₁	20	80	15	4	1	26
	M ₂	4	96	4	0	0	4
	M ₃	4	96	4	0	0	4
	Mean ± SD	10.0 ± 7.89	90.0 ± 7.89	8.16 ± 5.84	1.5 ± 1.64	0.33 ± 0.51	12.1 ± 10.4
N-Nitroso-N-Ethylurea (50 mg/kg)	F ₁	95	5	74	15	6	122
	F ₂	88	12	67	20	1	110
	F ₃	95	5	80	10	5	115
	M ₁	95	5	74	16	5	121
	M ₂	93	7	82	8	3	107
	M ₃	95	5	91	4	0	99
	Mean ± SD	93.5* ± 2.8	6.5* ± 2.81	78.0* ± 8.27	12.1* ± 5.8	3.33* ± 2.4	112.3* ± 8.8

* Significantly different from the negative control ($p < 0.001$).

¹Total number of damaged cells (class 1+2+3).