

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS  
JULIANA YOSHIDA PÚBLIO

EVIDÊNCIAS SIMULTÂNEAS DE AUSÊNCIA DE GENOTOXICIDADE E ANTI  
GENOTOXICIDADE DE *Zizyphus joazeiro* Mart. (RASPÁ-DE-JUÁ) USANDO O ENSAIO  
DO MICRONÚCLEO

Alfenas-MG

2012

JULIANA YOSHIDA PÚBLIO

EVIDÊNCIAS SIMULTÂNEAS DE AUSÊNCIA DE GENOTOXICIDADE E ANTI  
GENOTOXICIDADE DE *Zizyphus joazeiro* Mart. (RASPÁ-DE-JUÁ) USANDO O ENSAIO  
DO MICRONÚCLEO

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador(es):

João Evangelista Fiorini, PHARM, MSc, PhD.  
Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, BSB, MSc, PhD.

Alfenas-MG

2012

Públio, Juliana Yoshida

Evidências simultâneas de ausência de genotoxicidade e anti genotoxicidade de *Zizyphus joazeiro* Mart. (Raspa-de-Juá) usando o ensaio/.—  
Juliana Yoshida Públio -- Alfenas, 2012.

76 f.

Orientador: Prof. Dr Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-  
Universidade José do Rosário Vellano.

1. *Zizyphus joazeiro* Mart. 2. Ensaio do micronúcleo  
3. Medula óssea 4. Roedores 5. Mutagenicidade

I.Título CDU: 577.1 :634.662(043)

---



**UNIFENAS**  
Pesquisa e Pós-graduação

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**Título:** “EVIDÊNCIAS SIMULTÂNEAS DE AUSÊNCIA DE GENOTOXICIDADE E ANTI GENOTOXICIDADE DE ZIZYPHUS JOAZEIRO MART. (RASPA-DE-JUÁ) USANDO O ENSAIO DO MICRONÚCLEO”.

**Autor:** Juliana Yoshida Públio

**Orientador:** Prof. Dr. João Evangelista Fiorini, PHARM, MSc, PhD.

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, BSB, MSc, PhD.

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL** pela Comissão Examinadora.

Prof. Dr. João Evangelista Fiorini

Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

Prof. Dr. Luiz Carlos do Nascimento

Alfenas, 30 de Agosto de 2012.

Prof. Dr. Adayton Vilela de Rezende  
Coordenador do Programa  
Mestrado em Ciência Animal

*Dedico este trabalho aos meus pais, Dearson e Saeko, que sempre iluminaram o meu caminho.*

Agradeço, primeiramente, a *Deus* pela graça de freqüentar este curso e por ter me dado força e sabedoria, para aprimorar meus conhecimentos e trazer novas oportunidades.

Ao *Prof. Dr. João Evangelista Fiorini*, pelo apoio, simpatia e conhecimento seja ele no âmbito profissional como pessoal.

Ao *Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo*, grande incentivador da pesquisa, por todo ensinamento e dedicação para que este trabalho fosse concluído.

Aos demais *professores e funcionários* pelo carinho e atenção demonstrados ao longo do curso.

Aos *amigos* pela alegria e solidariedade na troca de informações.

Ao meu marido *Jader* pelo incentivo, paciência e compreensão durante este período de ausências.

A minha *família* pela oportunidade, apoio e amor incondicional.

À *Rede Mineira de Ensaaios Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos* (REDE MINEIRA TOXIFAR - 2012), *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG).

*“É durante as fases de maior adversidade que surgem as grandes oportunidades de se fazer o bem a si mesmo e aos outros”.*

*“Dalai Lama”*

## RESUMO

PÚBLIO, Juliana Yoshida. **Evidências simultâneas de ausência de genotoxicidade e anti genotoxicidade de *Zizyphus joazeiro* Mart. (raspa-de-juá) usando o ensaio do micronúcleo.** 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - UNIFENAS, Alfenas, 2012.

A atividade terapêutica de *Zizyphus joazeiro* Mart. (Raspa-de-Juá) tem sido demonstrada a partir de algumas pesquisas, como por exemplo, propriedades antifúngica, antibacteriana, antipirética e antioxidante. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a mutagenicidade do extrato glicólico da casca de *Z. joazeiro* Mart. (GEZJP) usando o ensaio do micronúcleo *in vivo* na medula óssea de camundongos heterogênicos *Swiss albinus* (Unib:SW). A sua associação sobre os efeitos genotóxicos induzidos pela DOX também foi analisada. Grupos experimentais foram avaliados após 24-48h de tratamento com NEU e DOX (controles positivos), NaCl (controle negativo), e GEZJP (500-2.000 mg.Kg<sup>-1</sup>). Ensaio anti-mutagênicos foram realizados usando os controles positivos associados à GEZJP, separadamente. As frequências de PCEs e PCEMNs, e a relação PCE/NCE por animal foram analisadas. Diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) foram observadas (i) entre as frequências de PCEMNs dos tratamentos controles positivos e negativos, (ii) entre os tratamentos controles positivos (NEU/DOX) e experimentais mutagênicos (500-2.000 mg.Kg<sup>-1</sup> de GEZJP), e (iii) entre os tratamentos controles positivos (NEU/DOX) e experimentais anti-mutagênicos (GEZJP+DOX ou GEZJP+NEU). Quanto à relação PCE/NCE, diferenças significativas não foram encontradas entre (i) os tratamentos controles negativos e anti-mutagênicos (i.e., GEZJP+DOX), e (ii) entre os tratamentos mutagênicos (GEZJP), controles positivos e anti-mutagênicos (i.e., GEZJP+NEU). Os resultados sugerem inexistência de mutagenicidade (mecanismos clastogênicos e/ou aneugênicos) do GEZJP, independentemente da dose e do tempo de tratamento, muito embora uma resposta variável tenha sido observada entre os gêneros (masculino e feminino). As relações PCE/NCE observadas sugerem toxicidade sistêmica do GEZJP, independentemente da dose, do tempo e do gênero do animal. Contudo, o GEZJP pode apresentar propriedades fitoquímicas contra os efeitos genotóxicos e/ou tóxicos induzidos pelo quimioterápico DOX.

**Palavras-chave:** *Zizyphus joazeiro* Mart., Raspa-de-Juá, ensaio do micronúcleo, medula óssea, roedores, mutagenicidade e anti-mutagenicidade.



## ABSTRACT

PÚBLIO, Juliana Yoshida. **Reduction of the DOX-induced genotoxic effects and nonmutagenic effects of *Ziziphus joazeiro* mart. revealed by micronucleus assays.** 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - UNIFENAS, Alfenas, 2012.

The therapeutic activity of *Ziziphus joazeiro* Mart. (raspa-de-Juá) has been demonstrated from some studies, such as, antifungal, antibacterial, antipyretic and antioxidant properties. The aim of this research was to evaluate the mutagenicity of glycolic extract of *Z. joazeiro* Mart. (GEZJ) barks using the micronucleus assay in bone marrow of mice (heterogenetic *Swiss albinus* – Unib: SW). The interaction between GEZJ and the genotoxic effects of doxorubicin (DOX) was also analysed. Experimental groups were evaluated after 24-48 h of treatment with N-Nitroso-N-ethylurea (NEU) and DOX (positive controls), NaCl (a negative control) and GEZJ (250-2,000 mg.Kg<sup>-1</sup>). Anti-mutagenic assays were carried out using the GEZJ in combination with these positive controls (GEZJ+NEU and GEZJ+DOX). The frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) was significantly different ( $p < 0.05$ ) between (i) the positive and negative control treatments, (ii) the positive controls and animals treated with GEZJ and (iii) animals treated with positive controls (NEU or DOX) and GEZJ combined with these positive controls. There was no mutagenicity (clastogenicity/aneugenicity) observed in GEZJ regardless of the dose and time, but a variable response was observed among genders of mouse. The anti-mutagenic effects of GEZJ suggest a potential protective mechanism against DOX-induced genotoxic effects.

**keywords:** *Zizyphus joazeiro* Mart., *Raspa-de-Juá*, micronucleus assay, bone marrow, rodents, mutagenicity and anti-mutagenicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Protocolo experimental para o ensaio mutagênico e anti-mutagênico extrato glicólico da casca de <i>Z. joazeiro</i> Mart. (Raspa-de-Juá) .....	24
--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Incidência de PCEMNs e relação de PCE/NCE em medula óssea de camundongos <i>Swiss albinus</i> (machos e fêmeas) após tratamentos (24 e 48 horas) controles <sup>+/-</sup> (NaCl, NEU e DOX), experimental mutagênico (GEZJP) e anti-mutagênico (GEZJP + NEU e GEZJP + DOX). Análise estatística de variância one-way (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 9 × 2 × 2 (tratamento × gênero × tempo), e comparação de médias por meio do teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) empregando o sistema computacional SAS <sup>®</sup> versão 9.2 .....	32
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise da variância <i>one-way</i>
BFB	<i>Breakage-fusion-bridge</i>
cDNA	<i>Complementary desoxirribonucleic acid</i>
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEPEAU	Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da UNIFENAS
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
DOX	Cloridrato de doxorrubicina
DSBs	<i>Double-strand breaks</i>
E	Eutanásia
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
g	Gramas
GEZJ	<i>Glicolic extract of Zizhipus. joazeiro Mart.</i>
Kg	Quilogramas
µL	Microlitros
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MN	<i>Micronucleus</i>
MNPCEs	<i>Micronucleated polychromatic erythrocytes</i>
<i>n</i>	Número de camundongos
NaCl	<i>Sodium chloride</i>
NBUD	<i>Nuclear budding</i>
NCE	<i>Normochromatic erythrocyte</i>
NPB	<i>Nucleoplasmic bridge</i>
NEU	<i>N-Nitroso-N-ethylurea</i>
PCE	<i>Polychromatic erythrocyte</i>
SSBs	<i>Single-strand breaks</i>
T	Tratamento
Unib:SW	Camundongos heterogênicos <i>Swiss albinus</i>

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	14
2.	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS .....	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA .....	17
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1.	Fitoterápicos .....	21
4.2.	Sistema-Teste <i>in vivo</i> .....	21
4.3.	Grupos experimentais .....	22
4.4.	Processamento da medula óssea .....	22
4.5.	Análise estatística .....	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
6.	REFERÊNCIAS .....	33
7.	ANEXOS .....	43
8.	ARTIGO CIENTÍFICO .....	47
9.	SUBMISSÃO DE ARTIGO .....	74

## 1. INTRODUÇÃO

Pela primeira vez na literatura, a presente pesquisa vem contribuir com o conhecimento acerca dos efeitos mutagênicos (clastogênia e/ou aneugênia) e anti-mutagênicos do extrato glicólico (pós-processo de extração alcoólica) de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Raspa-de-Juá) empregando o ensaio do MN em PCE da medula óssea de camundongos *Swiss albinus*.

A inexistência de mutagenicidade (mecanismos clastogênicos e/ou aneugênicos) da casca de *Ziziphus joazeiro* Mart., independentemente da dose de administração fitoterápica (500-2.000 mg.Kg<sup>-1</sup>) e do tempo de tratamento (24 e 48h), porém com resposta variável entre os gêneros (masculino e feminino), foi demonstrada na presente pesquisa. Elevada genotoxicidade do DOX também foi observada a partir de uma dosagem acima daquela administrada em humanos, em comparação àquela mutagenicidade do controle positivo NEU usado no ensaio do MN, independentemente do tempo e do gênero do animal. Contudo, efeitos anti-mutagênicos da casca de *Z. joazeiro* Mart., quando associado ao tratamento quimioterápico do DOX (i.e., redução/eliminação dos efeitos genotóxicos induzidos pela DOX na medula óssea de camundongos), foram demonstrados.

A relação PCE/NCE observada no tratamento com *Z. joazeiro* Mart. revelou uma toxicidade sistêmica, independentemente das concentrações administradas, do tempo de tratamento (24 e 48h) e do gênero do animal (masculino e feminino). Essa toxicidade também foi observada no tratamento com o DOX. Contudo, uma significativa redução dessa toxicidade foi observada na associação dos tratamentos do DOX e *Z. joazeiro* Mart., sugerindo a existência de propriedades fitoquímicas que quando associadas ao DOX são capazes de reduzir os efeitos tóxicos induzidos pelo quimioterápico.

Outros estudos envolvendo a genotoxicidade de *Z. joazeiro* Mart. (Raspa-de-Juá) deveriam ser conduzidos [e.g., teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, teste de mutação gênica em células de mamíferos (*mouse lymphoma assay*), testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidia, teste do micronúcleo em células do micronúcleo *in vitro*, hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e sua aplicação à mutagênese, teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas, genômica funcional e proteômica em mutagênese (*cDNA arrays, microarrays analyses*), entre outros], a fim de caracterizar os seus potenciais efeitos e mecanismos de ação genotóxicos e anti-genotóxicos e, principalmente, para o

estabelecimento de limites ao consumo humano, de potenciais riscos à saúde humana ou, até mesmo, para implementação racional de estratégias quimiopreventivas.

## 2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Apesar de algumas pesquisas suportarem a efetividade do potencial terapêutico de *Z. joazeiro* Mart., a inexistência de investigações visando o conhecimento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos tem sido observado até o momento. Objetivando contribuir com as informações sobre o potencial genotóxico de fitoterápicos, a presente pesquisa avaliou os efeitos mutagênicos do extrato glicólico da casca de *Z. joazeiro* Mart. (Raspa-de-Juá) usando o ensaio do micronúcleo *in vivo* na medula óssea de camundongos. A ação da concentração máxima permitida do *Z. joazeiro* Mart. sobre os efeitos genotóxicos induzidos pela doxorubicina também foi estudada (i.e., avaliação anti-mutagênica).



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

Pesquisas envolvendo plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. Considerável parcela da população mundial utiliza a medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior parte dessa terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios biologicamente ativos (FARNSWORTH et al., 1985; KAUR et al., 2005). No Brasil, cerca de 8% das 100.000 espécies vegetais catalogadas foram estudadas quanto as suas propriedades químicas, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas (GARCIA et al., 1996). O panorama brasileiro na área farmacêutica revela um gasto de aproximadamente dois a três bilhões de dólares por ano na importação de matérias-primas empregadas na produção de medicamentos. Ainda, tal panorama mostra que 84% dos fármacos consumidos no país provêm da importação e 78-80% dos fármacos produzidos provêm das empresas multinacionais (BERMUDEZ, 1995; MIGUEL & MIGUEL, 1999), índices que justificam a busca de alternativas para superar a dependência externa por parte da indústria químico-farmacêutica brasileira.

Em adição, muitas espécies de plantas medicinais (p.ex., *Ziziphus joazeiro*, *Ruta graveolens*, *Mentha x villosa*, *Amburana cearensis*, *Plectranthus amboinicus*, *Anadenanthera colubrina*, *Ximenia americana* e *Myracrodruon urundeuva*) são também utilizadas popularmente pelas comunidades localizadas na região da Caatinga brasileira para tratar um amplo espectro de condições clínicas que variam desde diversas doenças até cuidados paliativos ou dores gerais (i.e., bronquite, sinusite, rinite, congestão nasal, dores de cabeça, gripe, febre, expectorante, cólica, hipertensão, trombose, indigestão, problemas renais, intestinais e hepáticos, processos infecciosos e inflamatórios, dores em geral, entre outros) (CARTAXO et al., 2010). *Z. joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) é uma árvore nativa resistente a seca (CARTAXO et al., 2010), representando uma fonte de água e alimento para os animais em condições extremas de aridez (CALDAS, 1960; CRUZ, 1985; NUNES et al., 1987).

A composição fitoquímica de *Z. joazeiro* Mart. revelou um conteúdo rico em *n*-alcanos (78,6%) em sua cera epicuticular foliar, o constituinte mais eficiente contra a permeabilidade da água, e a presença de triterpenóides (OLIVEIRA et al., 2003). Em outra investigação fitoquímica de compostos antimicrobianos, a partir do extrato diclorometano da casca de *Z. joazeiro* Mart., foi demonstrado a existência de triterpenóides com fraca atividade antibacteriana (i.e., ácido betulínico, ácido alfitaólico e ácido ursólico) e marcável atividade

contra *Staphylococcus epidermidis* [i.e., derivados ester do ácido betulínico: 7 $\beta$ -(4-hidroxi-benzoiloxi), 7 $\beta$ -(4-hidro-3-metoxi-benzoiloxi) e 27-(4-hidroxi-3-metoxi-benzoiloxi)] (SCHUHLY et al., 1999). A casca de *Z. joazeiro* Mart. também apresenta abundância de saponinas, a qual tem sido usada como dentifrícios, cujo extrato aquoso evidenciou ação antimicrobiana frente as bactérias (células planctônicas ou biofilmes artificiais) relacionadas com cárie dental e doenças periodontais (ALVIANO et al., 2008). Outras aplicações terapêuticas populares de *Z. joazeiro* Mart. [i.e., tratamento de caspa, reumatismo, limpeza dos dentes, gripe, febre, bronquite crônica, úlceras gástricas, indigestão, azia e dores de cabeça (SHUHLY et al., 1999; CARTAXO et al., 2010)] e algumas experimentalmente científicas [i.e., potencial antifúngico (CRUZ et al., 2007), antibacteriano (ALVIANO et al., 2008; LEAL et al., 2010; SHUHLY et al., 1999), antioxidante (ALVIANO et al., 2008), antipirético (NUNES et al., 1987) e baixa toxicidade (ALVIANO et al., 2008)] foram relatadas.

Compostos biologicamente ativos têm sido reconhecidos quanto as suas propriedades farmacológicas, contudo vários desses compostos não puderam ser introduzidos em terapêutica devido às suas propriedades toxicológicas, carcinogênicas e mutagênicas (AMES, 1983; KONSTANTOPOULOU et al., 1992; TAVARES, 1996). No desenvolvimento de novos fármacos, as análises dos ensaios de genotoxicidade representam considerável peso, visto que a maioria das indústrias farmacêuticas delibera o processamento de um novo agente terapêutico com base também nos dados de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (PURVES et al., 1995). Nesse contexto, os ensaios para avaliação da atividade mutagênica das plantas usadas pela população bem como suas substâncias isoladas, são necessários e importantes para estabelecer medidas de controle no uso indiscriminado. Além disso, é preciso esclarecer os mecanismos e as condições que mediarão o efeito biológico, antes que as plantas sejam consideradas como agentes terapêuticos (VARANDA, 2006).

Os efeitos genotóxicos de um agente mutagênico potencial dependem do seu alvo celular. Alguns compostos químicos necessitam ser metabolizados antes de adquirir sua capacidade mutagênica (MATEUCA et al., 2006). Agentes mutagênicos podem induzir alterações genômicas atingindo direta e/ou indiretamente a molécula de DNA, ou ligando-se às proteínas envolvidas na manutenção da integridade genômica (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). As conseqüências das interações entre os agentes mutagênicos e os seus alvos podem conduzir a diferentes tipos de danos no DNA (aductos de DNA, sítios alcalinos lábeis, rupturas dos filamentos) e mutações que vão desde alterações nucleotídicas simples (mutações gênicas) até alterações cromossômicas (mutações cromossômicas) numéricas ou estruturais

(mutações genômicas). Finalmente, o destino celular é então determinado pelas várias lesões provocadas sobre o genoma e a capacidade celular intrínseca de reparo ou processos de morte celular programada – apoptose (RECORDIER et al., 2002).

Tanto quanto os estudos de genotoxicidade estão preocupados, o ensaio do micronúcleo *in vivo* (*micronucleus* – MN) em medula óssea de roedores desempenha um papel crucial à bateria de testes que objetivam a identificação de riscos por agentes mutagênicos (MATEUCA et al., 2006), especialmente à avaliação de riscos mutagênicos em que permite a consideração de fatores metabólicos *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparo do DNA, embora estes possam variar entre as espécies, entre tecidos e entre os mecanismos genéticos (OECD, 1997ab; RIBEIRO et al., 2003). Uma vez que o eritroblasto da medula óssea se desenvolve em um eritrócito policromático (*polychromatic erythrocyte* – PCE) (i.e., célula originada após a extrusão do núcleo principal), qualquer micronúcleo que tem sido formado pode permanecer atrás, de outro modo, no citoplasma anucleado. Deste modo, a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (*micronucleated polychromatic erythrocytes* – MNPCEs) tem sido o principal *endpoint*. Por outro lado, a mensuração de MNPCEs em sangue periférico tem sido igualmente aceitável em qualquer espécie na qual a inabilidade do baço remover eritrócitos micronucleados tem sido demonstrada, ou a qual tem mostrado uma adequada sensibilidade para detectar agentes que causam aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais. Os resultados positivos (i.e., um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em animais tratados) indicam que uma substância induz a formação de micronúcleos, os quais surgem como um resultado de danos cromossômicos ou danos ao aparato mitótico nos eritroblastos das espécies teste, enquanto que os resultados negativos indicam que, sob as condições experimentais, a substância teste não induz a produção de micronúcleos nos eritrócitos imaturos das espécies teste. Todavia, o número de eritrócitos normocromáticos (*normochromatic erythrocyte* – NCE) no sangue periférico, que contém micronúcleos entre um dado número de eritrócitos maduros, pode também ser usado como *endpoint* deste ensaio (OECD, 1997c; RIBEIRO et al., 2003). Além disso, o conhecimento dos efeitos genotóxicos induzidos por fitoterápicos e alimentos empregando o ensaio do MN *in vivo* em mamíferos tem sido o anseio de vários grupos de pesquisadores (CHANDRASEKARAN et al., 2011; SILVA et al., 2011; INDART et al., 2007; VENKATESH et al., 2007; ALVES et al., 2012).

Micronúcleos (MN) são corpos extranucleares pequenos que surgem durante a divisão celular a partir de fragmentos cromossômicos / cromossômicos acêntricos ou cromossomos / cromátides totais que se atrasam na anáfase e não são incluídos nos núcleos filhos durante a

telófase (FENECH & MORLEY, 1985). Micronúcleos abrigando fragmentos cromossômicos podem resultar de quebras do DNA de fita dupla, conversão de quebras de fita simples (*single-strand breaks* – SSBs) em quebras de fitas duplas (*double-strand breaks* – DSBs) após a replicação celular, ou inibição de síntese de DNA. O reparo equivocado de duas quebras cromossômicas pode conduzir a um rearranjo cromossômico assimétrico produzindo um cromossomo dicêntrico e um fragmento acêntrico. Frequentemente, os centrômeros de cromossomos dicêntricos são puxados para pólos opostos das células durante a anáfase resultando na formação de uma ponte nucleoplásmica (*nucleoplasmic bridge* – NPB) entre os núcleos filhos e um fragmento acêntrico que fica atrasado para formar um MN (FENECH, 2005; THOMAS et al., 2003). Micronúcleos abrigando cromossomos totais são essencialmente formados a partir de defeitos na maquinaria de segregação cromossômica tais como deficiências nos genes que controlam o ciclo celular, falha do fuso mitótico, cinetócoro, ou outras partes do aparato mitótico ou por danos até subestruturas cromossômicas, rompimento mecânico (ALBERTINI et al., 2000) e hipometilação do DNA centromérico (FENECH, et al., 2005). Micronúcleos podem também surgir por amplificação gênica via ciclos de quebra-fusão-ponte (*breakage-fusion-bridge* – BFB), quando o DNA amplificado está seletivamente localizado em locais específicos da periferia do núcleo e eliminado via brotamento nuclear (*nuclear budding* – NBUD) durante a fase S do ciclo celular (FENECH, 2002). O destino do MN após a sua formação na célula micronucleada é pobremente entendido. Seu destino pós-mitótico inclui: (i) eliminação da célula micronucleada como uma consequência da apoptose (DECORDIER et al., 2002), (ii) expulsão da célula (quando o DNA dentro do MN não é esperado para ser funcional ou capaz de replicação devido a ausência dos componentes citoplasmáticos necessários); (iii) reincorporação dentro do núcleo principal (quando o cromossomo reincorporado pode ser indistinguível daqueles do núcleo principal e pode retomar a atividade biológica normal); retenção dentro do citoplasma da célula como uma entidade extra-nuclear (quando o MN pode completar um ou mais rodadas de replicação cromossômica/DNA) (LEACH & JACKSON-COOK, 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Fitoterápico

Extrato glicólico da casca de *Z. joazeiro* Mart. (Raspa-de-Juá) foi adquirido comercialmente e armazenado de acordo com as recomendações do fabricante (AKSY Comercial Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Esse extrato foi submetido ao processo de extração alcoólica em equipamento Evaporador Rotativo (Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., mod. MA-120) e suas densidades de massa e relativa foram determinadas pelo método de picnômetro (FARMACOPÉIA BRASILEIRA ANVISA/FIOCRUZ, 2010).

### 4.2. Sistema-Teste *in vivo*

Camundongos heterogênicos *Swiss albinus* (Unib:SW) adultos jovens (entre 7 e 12 semanas – período púbere), machos e fêmeas, com massa corporal entre 30 g e 40 g (i.e., a variação de peso entre os animais, para cada sexo, não deverá exceder a  $\pm 20\%$  da massa média) e saudáveis, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, Área da Ciência Animal de Laboratório, UNICAMP (CEMIB, <http://www.cemib.unicamp.br>), foram utilizados no teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea (CHORILLI et al., 2007; CSGMT, 1986).

Os animais foram mantidos em grupos do mesmo sexo, em caixas de polipropileno, em ambiente climatizado a  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa do ar igual a  $50\% \pm 20\%$ , e em ciclos de luminosidade de 12 horas (i.e., 12 horas claro/12 horas escuro). Estes foram tratados com ração comercial Labina Purina<sup>®</sup> (Nestlé Purina Petcare Company) e água *ad libitum*, e aclimatados às condições do laboratório por 7 dias (período experimental) antes da realização do experimento. Ao final do período experimental, cada animal foi pesado e, de acordo com o peso, recebeu tratamento de 100  $\mu\text{L}$  do líquido (NaCl 150 mM em água para injeção; extrato glicólico da casca de *Z. joazeiro* pós-processo de extração alcoólica – GEZJP; NEU; DOX) para cada 10 g de massa corpórea.

Cada animal foi devidamente identificado na cauda (marcações numéricas) a fim de assegurar a continuidade dos registros e das interpretações ao longo do estudo (OECD, 1997c). Após o tratamento experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas (*Report of the American*

*Veterinary Medical Association Panel Euthanasia, 2000*). O material contaminado foi acondicionado em sacos de plásticos duplos e armazenado em locais específicos até o momento de sua incineração, conforme as normas de segurança e saúde da instituição. Esta pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração Universal dos Direitos do Animal (UNESCO, 1978), os Princípios Éticos na Experimentação Animal (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA), a Lei de Crimes Ambientais Brasileira (*Lei Nº 9.605 de 12 de Fevereiro de 1998*), as Normas Brasileiras para a Prática Didático-Científica da Visseção de Animais (*Lei Nº 6.638 de 8 de maio de 1979*), e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da UNIFENAS (CEPEAU protocolo no. 04A/2008).

### **4.3. Grupos experimentais**

Grupos experimentais (i.e., cada grupo constituído por 3 machos e 3 fêmeas) foram avaliados após 24 e 48 horas de único tratamento administrado por gavagem (grupos experimentais do ensaio mutagênico: 7-14; grupos experimentais do ensaio anti-mutagênico: 15-18), conforme metodologia estabelecida previamente (OECD, 1997c). Grupos controles negativos (1 e 2) e positivos (3, 4, 5 e 6) também foram incluídos mediante único tratamento administrado de modo intraperitoneal (Figura 1).

### **4.4. Processamento da medula óssea**

A análise do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea de camundongos foi realizada 24 e 48 horas após o tratamento, empregando-se a metodologia descrita previamente (SCHMID, 1976; ZAMBRANO et al., 1982). Logo após a eutanásia, os fêmures foram cirúrgica e assepticamente removidos e os animais apropriadamente descartados. Cada fêmur foi seccionado na extremidade proximal e o conteúdo do canal medular foi lavado com 1,5 mL de solução de NaCl 150mM e transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL.

Esse material foi ressuscendido com o auxílio de uma pipeta Pasteur a fim de assegurar uma distribuição ao acaso das células da medula óssea. Então, a suspensão foi centrifugada a 1.000 r.p.m. (Centrífuga de Bancada Microprocessada Mod. NT 810, Nova Técnica Ind. Com. Equipamentos p/ Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) por 5 minutos. O sedimento resultante foi ressuscendido em 500 µL de solução de NaCl 150mM adicionado de formol 4% e o sobrenadante descartado. As lâminas foram preparadas por meio de esfregaço (2 lâminas por animal), secas a temperatura ambiente por 24 horas, e coradas em

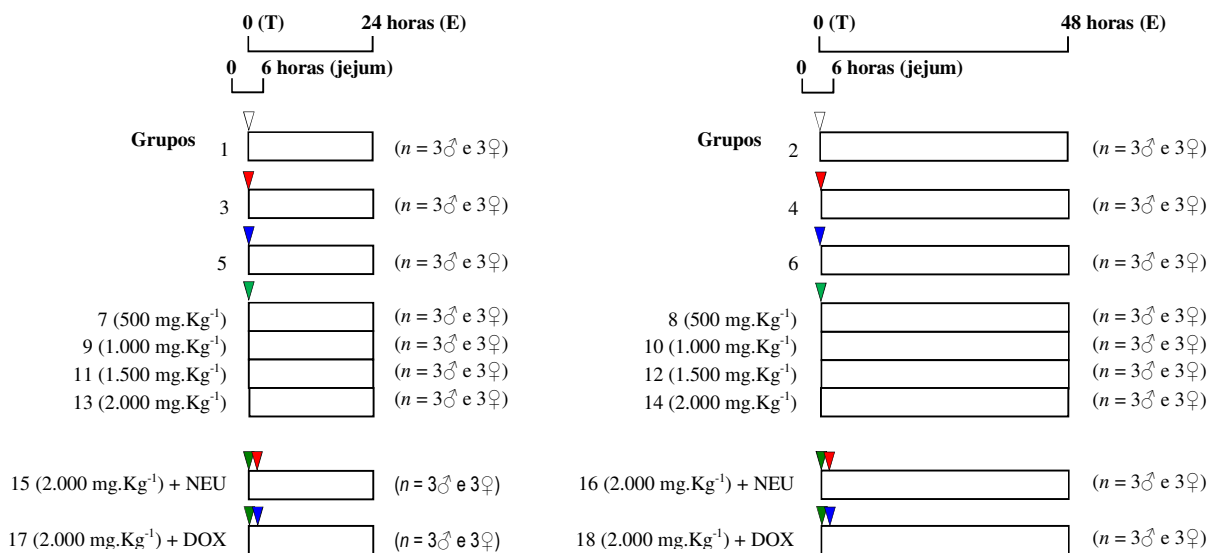
cuba de coloração contendo corante de Leishman eosina-azul de metileno [corante puro por 3 min, seguido pelo corante diluído em água destilada (1:6) por 15 min], a fim de diferenciar eritrócito policromático (PCE) de eritrócito normocromático (NCE).

Eritrócitos policromáticos (PCEs) foram observados em aumento de  $1.000 \times$  empregando-se microscopia óptica (Nikon Eclipse E-200), contados (2.000 eritrócitos policromáticos anucleados *per* animal) com o auxílio de um contador de células digital (Contador Diferencial CCS02, Kacil Indústria e Comércio Ltda., PE, Brasil) e fotografados (Câmera Digital 8.1 Megapixels DC FWL 150). O número de eritrócitos policromáticos (PCEs), o número e a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs), e a relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCE/NCE) foram relatados.

#### **4.5. Análise estatística**

Os dados obtidos no ensaio do micronúcleo foram submetidos à análise da variância *one-way* (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial  $9 \times 2 \times 2$  (tratamento  $\times$  gênero  $\times$  tempo), e comparação de médias por meio do teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) empregando o sistema computacional SAS<sup>®</sup> versão 9.2.

**Figura 1.** Protocolo experimental para o ensaio mutagênico e anti-mutagênico do extrato glicólico da casca de *Z. joazeiro* Mart. (Raspa-de-Juá).



∇ 150mM NaCl

▼ *N-Nitroso-N-ethylurea* 50 mg.Kg<sup>-1</sup> - NEU (Sigma N8509)

▽ Cloridrato de Doxorrubicina 5 mg.Kg<sup>-1</sup> (Eurofarma Laboratórios Ltda., ref. # L83608)

▽ Extrato glicólico da casca de *Z. joazeiro* Mart. (Raspa-de-Juá)

T (Tratamento)

E (Eutanásia)

*n* (número de camundongos)



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pesquisas envolvendo plantas medicinais agregam importantes informações para as novas descobertas e o desenvolvimento de potenciais quimioterápicos, além de auxiliar o estabelecimento de medidas seguras para o seu uso popular ou adequadas posologias (ELGORASHI et al., 2003; ARORA et al., 2005). De acordo com as aplicações terapêuticas populares, *Z. joazeiro* Mart. tem sido usada no tratamento de caspa, reumatismo, limpeza dos dentes, gripe, febre, bronquite crônica, úlceras gástricas, indigestão, azia e dores de cabeça (SHUHLY et al., 1999; CARTAXO et al., 2010). Em adição, *Z. joazeiro* tem demonstrado potencial antifúngico (CRUZ et al., 2007), antibacteriano (ALVIANO et al., 2008; LEAL et al., 2010; SHUHLY et al., 1999), antioxidante (ALVIANO et al., 2008), antipirético (NUNES et al., 1987) e baixa toxicidade (ALVIANO et al., 2008). Embora parciais, essas informações suportam o uso popular de *Z. joazeiro* para certos tratamentos e também corroboram com o valor etnofarmacológico das pesquisas na seleção de plantas para a triagem de bioatividade (CRUZ et al., 2007). Entretanto, investigações visando o conhecimento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de *Z. joazeiro* Mart. não foram encontradas até o momento, fato este que nos impulsionou avaliar os efeitos nocivos, sob a óptica mutagênica e anti-mutagênica (i.e., clastogenicidade e/ou aneugenicidade), do extrato glicólico da casca de *Z. joazeiro* Mart. (Raspa-de-Juá) usando o ensaio do MN *in vivo*. O ensaio do MN tem sido usado como um *endpoint* citogenético eficaz para a avaliação de danos cromossômicos induzidos por agentes químicos mutagênicos e carcinogênicos (YAMAMOTO & KIKUCHI, 1980; HEDDLE et al., 1981; HEDDLE et al., 1983). A formação do MN e a incidência de aberrações cromossômicas foram fortemente correlacionadas (HEDDLE et al., 1983; ALMASSY et al., 1987). Entre as várias técnicas usadas para detectar os efeitos genéticos e genotóxicos, o ensaio do MN tem sido considerado simples, barato, menos oneroso e de fácil e conveniente aplicação, particularmente em estudos genotóxicos (HEDDLE et al., 1983; SCHMID, 1975).

As análises estatísticas obtidas a partir dos números e das frequências de PCEMNs e da relação PCE/NCE na medula óssea de camundongos, para cada um dos tratamentos controles positivos e negativos, experimentais mutagênicos e anti-mutagênicos do extrato glicólico da casca de *Z. joazeiro* Mart. (Raspa-de-Juá), mostraram inexistência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos analisados (24 e 48h). Entretanto, para os experimentos mutagênicos e anti-mutagênicos, diferenças significativas dessas frequências de PCEMNs ocorreram entre os gêneros (masculino e feminino). Entre os três tratamentos

controles, os números e as frequências de PCEMNs revelaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) (i.e., NaCl *grupo Tukey D e D'*, NEU *grupo Tukey B e B'* e DOX *grupo Tukey A e A'*). Do mesmo modo, essas diferenças foram observadas entre os tratamentos controles positivos e experimentais mutagênicos (i.e., NEU *grupo Tukey B e B'*, DOX *grupo Tukey A e A'* e 500-2.000 mg.Kg<sup>-1</sup> de GEZJP *grupo Tukey CD-D e CD'-D'*), ou ainda, entre os tratamentos controles positivos e experimentais anti-mutagênicos (i.e., NEU *grupo Tukey B e B'*, DOX *grupo Tukey A e A'* e 2.000 mg.kg<sup>-1</sup> de GEZJP + 5 mg.Kg<sup>-1</sup> de DOX *grupo Tukey CD e CD'* ou 2.000 mg.kg<sup>-1</sup> de GEZJP + 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de NEU *grupo Tukey C e C'*). Nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos controles negativos (NaCl), experimentais mutagênico (GEZJP) e anti-mutagênico (GEZJP + DOX) (Tabela 1). Esses resultados apontam para as seguintes sugestões:

(i) inexistência de mutagenicidade (mecanismos clastogênicos e/ou aneugênicos) do GEZJP, independentemente da dose de administração fitoterápica (500-2.000 mg.Kg<sup>-1</sup>) e do tempo de tratamento (24 e 48h), muito embora uma resposta variável tenha sido observada entre os gêneros (masculino e feminino). Tais evidências foram suportadas conforme os dados das alterações genéticas espontâneas observadas no tratamento controle negativo (150mM NaCl);

(ii) existência de mutagenicidade (clastogenia e/ou aneugenia) elevada do DOX sob dosagem de 5 mg.Kg<sup>-1</sup> [i.e., dosagem acima daquela administrada de modo quimioterápico em humanos: de 0,55 a 1,25 mg.Kg<sup>-1</sup> considerando indivíduos de 90 e 40 Kg (50 mg.ampola<sup>-1</sup>), respectivamente; de 0,11 a 0,25 mg.Kg<sup>-1</sup> considerando indivíduos de 90 e 40 Kg (10 mg.ampola<sup>-1</sup>), respectivamente], cujas frequências de PCEMNs foram expressivamente acima daquelas observadas no controle positivo NEU (50 mg.Kg<sup>-1</sup>) do ensaio do MN, independentemente do tempo de tratamento (24 e 48h) e do gênero do animal (masculino e feminino);

(iii) efeitos anti-mutagênicos (clastogenia e/ou aneugenia) do GEZJP (2.000 mg.Kg<sup>-1</sup>) quando associado com o tratamento quimioterápico do DOX (5 mg.Kg<sup>-1</sup>), isto é, o GEZJP pode apresentar propriedades fitoquímicas contra os efeitos genotóxicos induzidos pela DOX na medula óssea de camundongos. Contudo, efeitos anti-mutagênicos dessa associação (DOX + GEZJP), empregando doses  $\leq 2.000$  mg.Kg<sup>-1</sup>, permanece uma intrigante questão a ser explorada.

Em adição, as análises obtidas a partir da relação PCE/NCE mostraram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos controles positivo (i.e., NEU *grupo Tukey C''* e DOX *grupo Tukey BC''*) e negativo (i.e., NaCl *grupo Tukey A''*), ou ainda, entre os tratamentos controles

positivo e aquele anti-mutagênico envolvendo o DOX (i.e., GEZJP + DOX *grupo Tukey A''*). Portanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os tratamentos controle negativo e anti-mutagênico envolvendo o DOX. Essas diferenças também não foram observadas entre as diversas concentrações do GEZJP administradas nos tratamentos experimentais mutagênicos (i.e., 500-2.000 mg.Kg<sup>-1</sup> de GEZJP *grupo Tukey BC''*), sendo esses dados compatíveis aos tratamentos controles positivos (i.e., DOX *grupo Tukey BC''* e NEU *grupo Tukey C''*) e o anti-mutagênico envolvendo o NEU (i.e., GEZJP + NEU *grupo Tukey BC''*). Esses resultados sugerem a existência de toxicidade sistêmica do GEZJP, independentemente das concentrações administradas (conforme suportado pela observação da toxicidade do NEU e DOX, separadamente), bem como a existência de toxicidade sistêmica do DOX sob dosagem de 5 mg.Kg<sup>-1</sup>, independentemente do tempo de tratamento (24 e 48h) e do gênero do animal (masculino e feminino). Todavia, há uma significativa redução dessa toxicidade quando o tratamento do DOX está associado ao GEZJP, conforme suportado pelas observações da toxicidade do DOX apenas e a inexistência da toxicidade do controle negativo NaCl. Esses resultados também sugerem a presença de propriedades fitoquímicas em GEZJP que quando associadas ao DOX são capazes de reduzir os efeitos tóxicos induzidos pelo quimioterápico, bem como os seus próprios efeitos de toxicidade. Pela primeira vez, a presente pesquisa deposita informações acerca dos efeitos mutagênicos e anti-mutagênicos de *Z. joazeiro* Mart., muito embora sem qualquer inferência da sua composição fitoquímica.

A toxicidade aguda dos extratos de algumas plantas, incluindo *Z. joazeiro* Mart., foi determinada a partir de uma única dose oral do extrato da planta (1-5 g.Kg<sup>-1</sup>) em diferentes grupos de camundongos (i.e., cada grupo compreendendo quatro animais machos e quatro animais fêmeas). Outros parâmetros comportamentais, incluindo convulsões, hiperatividade, sedação, aliciamento, perda de reflexo, respiração aumentada ou diminuída, e ingestão de alimentos água foram também analisados (ALVIANO et al., 2008). Nenhuma perda de massa corpórea foi observada após um período de 14 dias. Os camundongos tratados não apresentaram alterações comportamentais e uma DL50 correspondente às variações entre 2,0-3,5 g.Kg<sup>-1</sup> foi obtida. Aqueles extratos não apresentaram efeitos letais aos camundongos nas doses testadas e os seus dados a partir dos ensaios *in vivo* indicaram baixa toxicidade (ALVIANO et al., 2008). Nossos resultados corroboram com esses últimos achados, visto a existência de toxicidade sistêmica do *Z. joazeiro* Mart. em camundongos machos e fêmeas, após os tratamentos de 24h (efeito agudo) e 48h (efeito crônico) e independentemente das concentrações administradas (i.e., 500-2.000 mg.Kg<sup>-1</sup>).

A genotoxicidade de drogas anti-câncer é de especial interesse devido ao risco de indução de neoplasias secundárias. Pacientes submetidos aos tratamentos com agentes quimioterápicos para mieloma múltiplo, doença de Hodgkin, e tumores ovarianos estão em risco para o desenvolvimento de tumores secundários após a contemplação do tratamento (CANELLOS et al., 1975; CASCIATO & SCOTT, 1979; FERGUSON & PEARSON, 1996). O uso de agentes citoprotetores representa um método alternativo para a redução da toxicidade radioterapêutica e quimioterapêutica em tecidos normais (HOSPERS et al., 1999), prevenindo assim o risco dos efeitos potencialmente genotóxicos tal como a formação de tumor secundário (FERGUSON & PEARSON, 1996). Para aqueles agentes, cuja dose máxima tolerada é limitada inicialmente pela mielossupressão, várias estratégias estão sob avaliação para permitir o escalonamento da dose, na esperança de obter melhores resultados clínicos com os medicamentos quimioterapêuticos atualmente disponíveis (VENKATESH et al., 2007).

A doxorubicina (DOX) é um importante agente anti-câncer entre as antraciclinas. Essa droga é considerada um componente importante de vários regimes quimioterapêuticos para o carcinoma de mama e o carcinoma de pequenas células de pulmão. Durante a metástase do carcinoma da tireóide, a DOX é provavelmente o melhor agente disponível (VENKATESH et al., 2007). A DOX é também um importante agente para o tratamento bem sucedido da doença de Hodgkin e linfomas de não-Hodgkin (YOUNG et al., 1981). Uma relação dose-resposta para a DOX em vários regimes curativos tem sido mostrada, e doses diminuídas resultam taxas de sobrevivência inferior (HITCHCOCK-BRYAN et al., 1986), enquanto que um aumento na dose de DOX é limitada devido à grave cardiotoxicidade, um principal problema na aplicação clínica de DOX. Existe um amplo corpo de evidência para mostrar que o alvo celular dominante da DOX é o DNA (MYERS, 1998). As antraciclinas são classificadas como inibidores da topoisomerase II, porque elas estabilizam eficazmente o complexo de clivagem dessa enzima [e.g., Topoisomerase II desempenha um importante papel na segregação de partes recentemente replicadas de cromossomos entrelaçados (HOLM et al., 1985; UEMURA & YANAGIDA, 1986), condensação e descondensação dos cromossomos, e superenrolamento do DNA intracelular (UEMURA et al., 1987; YANAGIDA & STERNGLANZ, 1990). A DNA topoisomerase II catalisa a quebra e a reunião de ambas as fitas de DNA, relaxa a torção superhelicoidal, e concatena ou desconcatena o DNA circular. A DNA topoisomerase II realiza essas transformações topológicas transportando um segmento de DNA de fita dupla através de uma quebra de fita dupla transitória mediado pela enzima num outro DNA (LIU et al., 1980)]. O efeito

genotóxico mais prontamente detectável de agentes que interagem com a topoisomerase em células somáticas é a formação de um complexo ternário consistindo de droga, estabilizando assim a quebra do DNA de fita dupla (ANDERSON & BERGER, 1994). A DOX é um potente inibidor da DNA topoisomerase II, fato este que estabiliza a quebra do DNA fita dupla e não permite a reunião delas, conduzindo à morte celular (KAUFMANN, 1989; DEL BINO et al., 1991; TREVINO et al., 2004). Essas quebras de DNA fita dupla podem subsequente conduzir às quebras cromossômicas que finalmente conduzirão à produção de MN, com subsequente divisão celular (NATARAJAN et al., 1986). A persistência de lesões de DNA em células tratadas com DOX tem sido confirmada pelo ensaio do MN. A incidência de micronúcleos mostra uma resposta á dose em triagem de larga escala para clastógenos suspeitos (HEDDLE et al., 1983). A atividade anti-tumor das antraciclinas é consistente com sua habilidade para interagir com o DNA celular, e essa interação não-covalente pode inibir a função de DNA ligases, helicases, e outras proteínas dependentes de DNA, em adição a topoisomerase II. Contudo, seus efeitos celulares estão de modo nenhum limitados a esses tipos de inibição enzimática. A DOX exibe uma ampla variedade de efeitos celulares, e é provável que nenhum único mecanismo de ação seja responsável pelo total de respostas clínicas e celulares observadas (MYERS, 1998; WEISS, 2006). A DOX forma um complexo estável com o ferro férrico, o qual reage com o oxigênio, formando ânions de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas. DOX é conhecida por causar quebras de DNA dupla fita, rearranjos cromossômicos e eventos mutacionais, e é um potente carcinógeno (ZWEIER, 1984). DOX tem sido reportado para induzir a formação de MN, cromatídio e aberrações cromossômicas: quebras de DNA fita simples e dupla *in vitro* e *in vivo* (BEAN et al., 1992; AL-HARBI, 1993; AL-SHABANAH, 1993; DELVAEYE et al., 1993; JAGETIA & NAYAK, 1996; JAGETIA & NAYAK, 2000; JAGETIA & ARUNA, 2000; SHAN et al., 1996; DHAWAN et al., 2003). A principal toxicidade aguda induzida pela DOX é a supressão da medula óssea, e a utilidade clínica em longo prazo é limitada por uma cardiotoxicidade crônica irreversível dependente de dose cumulativa, que se manifesta como insuficiência cardíaca congestiva ou cardiomiopatia (VAN ACKER et al., 1995; VAN ACKER et al., 2000).

Portanto, é essencial rastrear novos agentes farmacológicos que podem proteger as células normais contra a toxicidade cumulativa induzida pela DOX. As plantas, em virtude de sua ampla utilidade em medicina tradicional, são menos tóxicas e tem atraído à atenção de pesquisadores em torno do mundo no recente passado. As plantas contêm muitos compostos, e é provável que essas possam proporcionar melhores efeitos protetores do que uma única

molécula (VIDHYA & DEVRAJ, 1999). A presença de muitas moléculas em plantas pode ter a vantagem, como algumas delas podem neutralizar a toxicidade de outras, e como um resultado, o efeito líquido pode ser benéfico para o propósito terapêutico. Por exemplo, o efeito de várias concentrações (200, 250, 300, 350 e 400 mg/kg de massa corpórea) de *Aegle marmelos* sobre os efeitos genotóxicos induzidos por DOX na medula óssea de camundongos foi estudado (VENKATESH et al., 2007). O tratamento de camundongos com diferentes concentrações de DOX (5, 10, ou 15 mg.kg<sup>-1</sup> de massa corpórea) resultou em uma elevação dependente de dose na frequência de MNPCE bem como NCE na medula óssea, e foi acompanhado por um declínio dependente de dose da DOX na relação PCE/NCE. O tratamento oral de camundongos com *Aegle marmelos*, uma vez ao dia durante cinco dias consecutivos antes do tratamento da DOX, significativamente reduziu a frequência de micronúcleos induzidos pela DOX acompanhado por uma significativa elevação na relação PCE/NCE em todos os momentos de pontuação. Esse efeito quimioprotetor observado pode ser devido à soma total de interações entre diferentes ingredientes dessa mistura complexa. O grau de proteção dependeria da interação de componentes isoladamente ou em conjunto com o agente genotóxico. Os mecanismos de ação plausíveis de *Aegle marmelos* na proteção contra o insulto genômico induzido por DOX foram a eliminação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e <sup>•</sup>OH e outros radicais livres, aumento da capacidade antioxidante, restauração da atividade de topoisomerase II e a inibição da formação do complexo ferro-DOX (VENKATESH et al., 2007). Outro estudo foi realizado para avaliar o potencial genotóxico do extrato hidroalcoólico da folha de *Copaifera lansdorffii* Desf. e sua influência sobre a genotoxicidade induzida pelo agente quimioterapêutico DOX usando o ensaio do MN em sangue periférico de camundongos *Swiss*. Tais resultados demonstraram que *C. lansdorffii* Desf. não foi genotóxico e, ainda, em animais tratados com *C. lansdorffii* Desf. e DOX, o número de MN foi significativamente reduzido quando comparado aos animais que receberam apenas DOX. A atividade antioxidante putativa de um ou mais compostos ativos de *C. lansdorffii* Desf., entre eles dois principais flavonóides heterosídeos (quercitrina e afzelina), podem explicar o efeito dessa planta sobre a genotoxicidade de DOX (ALVES et al., 2012). Evidências simultâneas de efeitos não-genotóxicos e leve diminuição dos efeitos genotóxicos induzidos pela DOX das sementes de girassol (*Helianthus annuus* Linné) também foram demonstradas usando o ensaio do micronúcleo *in vivo* em medula óssea de camundongos (BORIOLLO et al., 2012). Os resultados dessa pesquisa sugeriram inexistência de genotoxicidade (clastogênia e/ou aneugênia) da tintura e dos óleos farmacêutico e alimentício de girassol, independentemente da dose, do tempo (exceto para o óleo alimentício o qual demonstrou um aumento na

proporção de MNPCEs em 48h) e do gênero (exceto para os óleos farmacêutico e alimentício os quais demonstraram um aumento na proporção de MNPCEs no gênero masculino e gênero feminino, respectivamente). Evidências de anti-genotoxicidade foram também observadas usando apenas a tintura de girassol associada ao tratamento com o DOX, o que sugeriu uma parcialidade dos efeitos genotóxicos induzidos pela DOX (BORIOLLO et al., 2012).

A relação PCE/NCE é um indicador da aceleração ou inibição de eritropoiese. Essa relação tem sido reportada para variar com o tempo de pontuação, e o declínio contínuo na relação PCE/NCE pode ser devido à inibição da divisão celular, morte de eritroblastos, remoção de células danificadas e/ou diluição do conjunto de células existentes com células recentemente formadas (VENKATESH et al., 2007). Vários mecanismos podem ter sido responsáveis pela citotoxicidade da DOX e a indução de micronúcleos (GEWIRTZ, 1999), incluindo a intercalação de DOX no DNA celular (PAINTER, 1978; KIYOMIYA et al., 2001), estabilização do complexo DNA-topoisomerase II (POMMIER et al., 1985; GUANO et al., 1999), toxicidade mediada por radicais livres causado pela ciclagem redox do radical semiquinona (BACHUR et al., 1979) ou formação de espécies de oxigênio reativo pelo complexo ferro-DOX (MYERS, 1998; ELIOT et al., 1984; KONOREV et al., 1999). Por outro lado, outros agentes químicos tais como o captopril e a desferrioxamina (AL-HARBI, 1993; AL-SHABANAH, 1993),  $\beta$ -caroteno e vitaminas A, C e E (LU et al., 1996; GULKAC et al., 2004; COSTA & NEPOMUCENO, 2006), tiol N-acetilcisteína, probucol, lovastatina e flavonóides hidrofílicos, tais como rutina e luteolina (D'AGOSTINI et al., 1998; AL-GHARABLY, 1996; BARDELEBEN et al., 2002; SADZUKA et al., 1997) têm sido reportados para reduzir os MNs / genotoxicidade / toxicidade induzidos por DOX em camundongos. Ainda, os defensores da medicina herbal sempre afirmam que as misturas são melhores do que as substâncias químicas puras, porque dezenas de compostos biologicamente ativos em plantas trabalham juntos para produzir um efeito maior do que qualquer uma substância química por si mesma (MACKENZIE, 2001).

**Tabela 1.** Incidência de PCEMNs e relação de PCE/NCE em medula óssea de camundongos *Swiss albinus* (machos e fêmeas) após tratamentos (24 e 48 horas) controles<sup>+/-</sup> (NaCl, NEU e DOX), experimental mutagênico (GEZJP) e anti-mutagênico (GEZJP + NEU e GEZJP + DOX). Análise estatística de variância *one-way* (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 9 × 2 × 2 (tratamento × sexo × tempo), e comparação de médias por meio do teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) empregando o sistema computacional SAS<sup>®</sup> versão 9.2.

Tratamento	Número de PCEs analisados		PCEMNs *		PCE/NCE		NCE (n)			
	24h	48h	24h (n) <sup>A</sup>	48h (n) <sup>A</sup>	24h (%) <sup>A'</sup>	48h (%) <sup>A'</sup>	24h <sup>A''</sup>	48h <sup>A''</sup>	24h	48h
<i>150 mM NaCl</i>										
Σ ♀	6276	6281	27	28	0,43	0,45	261,50	330,58	24	19
Σ ♂	6208	6260	28	35	0,45	0,56	67,48	156,50	92	40
Σ	12484	12541	55 <sup>D</sup>	63 <sup>1D</sup>	0,44 <sup>D'</sup>	0,50 <sup>D'</sup>	107,62 <sup>A''</sup>	212,56 <sup>A''</sup>	116	59
<i>N-Nitroso-N-ethylurea – NEU (50 mg.Kg<sup>-1</sup>)</i>										
Σ ♀	6034	6055	85	101	1,41	1,67	1,17	3,47	5166	1745
Σ ♂	6057	5984	194	109	3,20	1,82	1,04	0,96	5843	6216
Σ	12091	12039	279 <sup>B</sup>	210 <sup>B</sup>	2,31 <sup>B'</sup>	1,74 <sup>B'</sup>	1,10 <sup>C''</sup>	1,51 <sup>C''</sup>	11009	7961
<i>Cloridrato de Doxorubicina – DOX (5 mg.Kg<sup>-1</sup>)</i>										
Σ ♀	6253	6186	179	149	2,86	2,41	5,01	28,91	1247	214
Σ ♂	6212	6203	155	181	2,50	2,92	70,59	31,49	88	197
Σ	12465	12389	334 <sup>A</sup>	330 <sup>A</sup>	2,68 <sup>A'</sup>	2,66 <sup>A'</sup>	9,34 <sup>BC''</sup>	30,14 <sup>BC''</sup>	1335	411
<i>Extrato glicólico da casca de Z. joazeiro Mart. (Raspa-de-Juá)</i>										
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6216	6125	23	18	0,37	0,29	7,04	22,27	883	275
Σ ♂ <sup>B</sup>	6116	6177	23	31	0,38	0,50	33,24	50,22	184	123
Σ <sup>500 mg.kg<sup>-1</sup></sup>	12332	12302	46 <sup>D</sup>	49 <sup>D</sup>	0,37 <sup>D'</sup>	0,40 <sup>D'</sup>	11,56 <sup>BC''</sup>	30,91 <sup>BC''</sup>	1067	398
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6129	6167	30	27	0,49	0,44	5,79	11,46	1058	538
Σ ♂ <sup>B</sup>	6230	6121	38	41	0,61	0,67	6,81	17,34	915	353
Σ <sup>1,000 mg.kg<sup>-1</sup></sup>	12359	12288	68 <sup>D</sup>	68 <sup>D</sup>	0,55 <sup>D'</sup>	0,55 <sup>D'</sup>	6,26 <sup>BC''</sup>	13,79 <sup>BC''</sup>	1973	891
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6311	6223	55	45	0,87	0,72	4,90	5,54	1289	1124
Σ ♂ <sup>B</sup>	6278	6145	42	51	0,67	0,83	5,32	5,19	1181	1185
Σ <sup>1,500 mg.kg<sup>-1</sup></sup>	12589	12368	97 <sup>CD</sup>	96 <sup>CD</sup>	0,77 <sup>D'</sup>	0,78 <sup>CD'</sup>	5,10 <sup>BC''</sup>	5,36 <sup>BC''</sup>	2470	2309
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6225	6269	56	55	0,90	0,88	4,19	4,83	1485	1298
Σ ♂ <sup>B</sup>	6111	6103	45	57	0,74	0,93	3,39	5,04	1805	1211
Σ <sup>2,000 mg.kg<sup>-1</sup></sup>	12336	12372	101 <sup>CD</sup>	112 <sup>CD</sup>	0,82 <sup>D'</sup>	0,91 <sup>CD'</sup>	3,75 <sup>BC''</sup>	4,93 <sup>BC''</sup>	3290	2509
<i>Extrato glicólico da casca de Z. joazeiro Mart. (2,000 mg.kg<sup>-1</sup>) + NEU (50 mg.Kg<sup>-1</sup>)</i>										
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6195	6301	80	56	1,29	0,89	30,22	63,65	205	99
Σ ♂ <sup>B</sup>	6354	6420	93	98	1,46	1,53	25,83	5,94	246	1080
Σ	12549	12721	173 <sup>C</sup>	154 <sup>C</sup>	1,38 <sup>C'</sup>	1,21 <sup>C'</sup>	27,82 <sup>BC''</sup>	10,79 <sup>BC''</sup>	451	1179
<i>Extrato glicólico da casca de Z. joazeiro Mart. (2,000 mg.kg<sup>-1</sup>) + DOX (5 mg.Kg<sup>-1</sup>)</i>										
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6246	6265	67	55	1,07	0,88	115,67	179,00	54	35
Σ ♂ <sup>B</sup>	6234	6260	56	44	0,90	0,70	94,45	156,50	66	40
Σ	12480	12525	123 <sup>CD</sup>	99 <sup>CD</sup>	0,99 <sup>CD'</sup>	0,79 <sup>CD'</sup>	104,00 <sup>A''</sup>	167,00 <sup>A''</sup>	120	75

As letras A, B, C e D correspondem à escala padronizada de Tukey (letras idênticas não são significativamente diferentes.  $p < 0,05$ ).



## 6. REFERÊNCIAS

ALBERTINI, R. J. *et al.* IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, n. 2, p. 111–172, aug. 2000.

AL-GHARABLY, N. M. Effect of probucol on the cytological and biochemical changes induced by adriamycin in Swiss albino mice. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v. 94, n. 3, p. 289–303, dec. 1996.

AL-HARBI, M. M. Effect of captopril on the cytological and biochemical changes induced by adriamycin. **Food and Chemical Toxicology**, New York, n. 31, v. 3, p. 209–212, mar. 1993.

ALMASSY, Z. *et al.* The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection: a review. **International Journal of Radiation Applications and Instrumentation**, New York, v. 38, n. 4, p. 241–249, 1987.

AL-SHABANAH, O. A. Inhibition of adriamycin-induced micronuclei by desferrioxamine in *Swiss albino mice*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 301, n. 2, p. 107–111, feb. 1993.

ALVES, J. M. *et al.* In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology: JAT.**, Philadelphia, may 2012.

ALVIANO, W. S. *et al.* In vitro antioxidant potential of plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 53, n. 6, p. 545–552, jun. 2008.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, New York, v. 221, n. 4617, p. 1256–64, sept. 1983.

ANDERSON, R. D; BERGER, N. A. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 309, n. 1, p. 109–142, aug. 1994.

ARORA, S. *et al.* Evaluation of genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. **Journal of Environment Pathology, Toxicology and Oncology**, New York, v. 24, n. 3, p. 193–200, 2005.

BACHUR, N. R. *et al.* NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 2, p. 954–957, feb. 1979.

BARDELEBEN, R. V. *et al.* The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin protects cells from the antineoplastic drugs doxorubicin and etoposide. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 10, n. 4, p. 473–479, oct. 2002.

BEAN, C. L; ARMSTRONG, M. J; GALLOWAY, S. M. Effect of sampling time on chromosome aberration yield for 7 chemicals in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 265, n. 1, p. 31–44, jan. 1992.

BERMUDEZ, J. A. Z. Indústria farmacêutica, estado e sociedade. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2002. p.15.

CALDAS, R. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. In: UFCE. Antipyretic activity of an aqueous extract of *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 599–601, 1987.

CANELLOS, G. P. *et al.* Second malignancies complicating Hodgkin's disease in remission. **The Lancet**, London, v. 1, n. 7913, p. 947–949, apr. 1975.

CARTAXO, S. L; SOUSA, M. M. A; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 13, n. 2, p. 326–342, sept. 2010.

CASCIATO, D. A; SCOTT, J. L. Acute leukemia following prolonged cytotoxic agent therapy. **Medicine Baltimore**, Baltimore, v. 58, n. 1, p. 32–47, jan. 1979.

CHANDRASEKARAN, C. V. *et al.* Evaluation of the genotoxic potential of standardized extract of *Glycyrrhiza glabra* (GutGard™). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 61, n. 3, p. 373–380, dec. 2011.

CHORILLI, M. *et al.* Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, São Paulo, v. 88, n. 1, p. 7–13, 2007.

COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR THE MICRONUCLEUS TEST–CSGMT. Sex differences in the micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 172, n. 2, p. 151–163, nov. 1986.

COSTA, W. F; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 47, n. 1, p. 18–24, jan. 2006.

CRUZ, G. L. Dicionário das plantas úteis do Brasil. In: NUNES, P. H. M. *et al.* Antipyretic activity of an aqueous extract of *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 599–601, 1987.

CRUZ, M. C. S. *et al.* Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 111, n. 2, p. 409–412, may 2007.

D'AGOSTINI, F. *et al.* Inhibition by oral N-acetylcysteine of doxorubicin-induced clastogenicity and alopecia, and prevention of primary tumors and lung micrometastases in mice. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 3, n. 2, p. 217–224, aug. 1998.

DECORDIER, I. *et al.* Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. **Mutagenesis**, Swansea, v. 17, n. 4, p. 337–344, jul. 2002.

DEL BINO, G; SKIERSKI, J. S; DARZYNJIEWICZ, Z. The concentration dependent diversity of effects of DNA topoisomerase I and II inhibitors on the cell cycle of HL-60 cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 195, n. 2, p. 485–491, aug. 1991.

DELVAEYE, M. *et al.* DNA breakage, cytotoxicity, drug accumulation and retention in two human ovarian tumor cell lines AZ224 and AZ364 treated with adriamycin, modulated by verapamil. **Anticancer Research**, Athens, v. 13, n. 5, p. 1533–1538, sept./oct. 1993.

DHAWAN, A. *et al.* Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. **Mutagenesis**, Swansea, v. 18, n. 6, p. 487–490, nov. 2006.

ELGORASHI, E. E. *et al.* Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 143, n. 2, p. 195–207, jul. 2003.

ELIOT, H; GIANNI, L; MYERS, C. Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron complex. **Biochemistry Including Biophysical Chemistry and Molecular Biology**, Washington, v. 23, n. 5, p. 928–936, feb. 1984.

*Farmacopéia Brasileira*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA / Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Brasília, 2010.

FARNSWORTH, N. R. *et al.* Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organization**, Geneva, v. 63, n. 6, p. 965–981, 1985.

FENECH, M. *et al.* Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis: integrative Cancer Research**, New York, v. 26, n. 5, p. 991–999, may 2005.

FENECH, M; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleopasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis–block micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, n. 1–2, p. 131–136, jul. 2002.

FENECH, M; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 147, n. 1–2, p. 29–36, feb. 1985.

FERGUSON, L. R; PEARSON, A. E. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 355, n. 1–12, p. 1–12, aug. 1996.

GARCIA, E. S. *et al.* Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFGRS, 2002, p.15.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 57, n. 7, p. 727–741, apr. 1999.

GUANO, F. *et al.* Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 56, n. 1, p. 77–84, jul. 1999.

GULKAC, M. D. *et al.* Effects of vitamin A on doxorubicin-induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats. **Mutagenesis**, Swansea, v. 19, n. 3, p. 231–236, may 2004.

HEDDLE, J. A; RAJ, A. S; KREPINSKY, A. B. The micronucleus assay. Part II. *In vitro*. In: STICH, H. F; SAN, K. H. C. **Short-term Tests for Chemical Carcinogens**. New York: Springer, 1981. p. 250–254.

HEDLLE, J. A. *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, a report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 61–118, sept. 1983.

HITCHCOCK-BRYAN, S. *et al.* The impact of induction anthracycline on long-term failure-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Medical and Pediatric Oncology**, New York, v. 14, n. 4, p. 211–215, 1986.

HOLM, C. *et al.* DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. **Cell**, Cambridge, v. 41, n. 2, p. 553–563, jun. 1985.

HOSPERS, G. A; EISENHAUER, E. A; DE VRIES, E. G. The sulfhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio- and chemoprotective agents: a review, indications for use and prospects. **British Journal of Cancer**, London, v. 80, n. 5–6, p. 629–638, may 1999.

INDART, A. *et al.* Teratogenic actions of thermally-stressed culinary oils in rats. **Free Radical Research**, London, v. 36, n. 10, p. 1051–1058, oct. 2002.

JAGETIA, G. C; ARUNA, R. Correlation between cell survival and micronuclei-induction in HeLa cells treated with adriamycin after exposure to various doses of gamma-radiation. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 115, n. 3, p. 183–193, jun. 2000.

JAGETIA, G. C; NAYAK, V. Effect of doxorubicin on cell survival and micronuclei formation in HeLa cells exposed to different doses of gamma-radiation. **Strahlentherapie und Onkologie**, München, v. 176, n. 9, p. 422–428, sept. 2000.

JAGETIA, G. C; NAYAK, V. Micronuclei-induction and its correlation to cell survival in HeLa cells treated with different doses of adriamycin. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 110, n. 1–2, p. 123–128, dec. 1996.

KAUFMANN, S. H. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. **Cancer Research**, Baltimore, v. 49, n. 21, p. 5870–5878, nov. 1989.

KAUR, S. *et al.* The *in vitro* cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, n. 1, p. 15–20, feb. 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M. *et al.* Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 140–141, n. 141, p. 63–74, apr. 2003.

KIYOMIYA, K; MATSUO, S; KUREBE, M. Differences in intracellular sites of action of adriamycin in neoplastic and normal differentiated cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 47, n. 1, p. 51–56, 2001.

KONOREV, E. A; KENNEDY, M. C; KALYANARAMAN, B. Cell-permeable superoxide dismutase and glutathione peroxidase mimetics afford superior protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of reactive oxygen and nitrogen intermediates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 368, n. 2, p. 421–428, aug. 1999.

KONSTANTOUPOULOU, I. *et al.* Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. **Experientia**, Basel, v. 48, n. 6, p. 616–619, jun. 1992.

LEACH, N. T; JACHSON-COOK, C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 554, n. 1-2, p. 89–94, oct. 2004.

Leal, I. C. R. *et al.* Ceanothane and lupane type triterpenes from *Zizyphus joazeiro* – An anti-staphylococcal evaluation. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 76, n. 1, p. 47–52, jan. 2010.

LIU, L. F; LIU, C. C; ALBERTS, B. M. Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. **Cell**, Cambridge, v. 19, n. 3, p. 697–707, mar. 1980.

LU, H. Z. *et al.* Effects of beta-carotene on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**, Beijing, v. 17, n. 4, p. 317–320, jul. 1996.

MACKENZIE, D. Complementary medicine, a special report. Swallow it whole. **New Scientist.**, v. 2292, p. 38–40, 2001.

MATEUCA, R. *et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1515–1531, nov. 2006.

MIGUEL, M. D; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe Editorial, 1999.

MYERS, C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Seminars in Oncology**, Philadelphia, v. 25, n. 4, p. 10–14, aug. 1998.

NATARAJAN, A. T. *et al.* The nature and repair of DNA lesions that lead to chromosomal aberrations induced by ionizing radiations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 160, n. 3, p. 231–236, may 1986.

NUNES, P. H. M. *et al.* Antipyretic activity of an aqueous extract of *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 599–601, 1987.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Bacterial reverse mutation test**. 1997a.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **In vitro mammalian chromosome aberration test**. 1997b.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. 1997c.

OLIVEIRA, A. F. M; MEIRELLES, S. T; SALATINO, A. Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. **Annaes da Academia Brasileira de Ciencias**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 431–439, dec. 2003.

PAINTER, R. B. Inhibition of DNA replicon initiation by 4-nitroquinoline 1-oxide, adriamycin, and ethyleneimine. **Cancer Research**, Baltimore, v. 38, n. 12, p. 4445–4449, dec. 1978.

POMMIER, Y. *et al.* Effects of DNA intercalating agents on topoisomerase II induced DNA strand cleavage in isolated mammalian cell nuclei. **Biochemistry Including Biophysical Chemistry and Molecular Biology**, Washington, v. 24, n. 23, p. 6406–6410, nov. 1985.

PURVES, D. *et al.* Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**, Swansea, v. 10, n. 4, p. 297–312, jul. 1995.

RIBEIRO, L. R; MARQUES, E. K; SALVADORI, D. M. F. **Teste de micronúcleo em medula óssea de roedor *in vivo* : mutagênese ambiental.** Canoas-RS : Editora da ULBRA, 2003. p. 173-198.

SADZUKA, Y. *et al.* Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 1–7, jun. 1997.

SCHMID, W. In: Chemical Mutagens. HOLLENDER, A. **The micronucleus test for cytogenetic analysis.** New York: Plenum Press, 1976. p. 31–53.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 9–12, feb. 1975.

SCHUHLY, W. *et al.* New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 65, n. 8, p. 740–743, dec. 1999.

SHAN, K; LINCOFF, A. M; YOUNG, J. B. Anthracycline-induced cardiotoxicity. **Annals of Internal Medicine**, Bethesda, v. 125, n. 1, p. 47–58, jul. 1996.

SILVA, C. R. *et al.* Assessment of *Duguetia furfuracea* genotoxic and cytotoxic activity in bacteria and mice. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 149–156, feb. 2012.

SOUZA, Luiz Silva. **Ausência de genotoxicidade e redução dos efeitos genotóxicos induzidos por DOX da tintura de sementes de *Helianthus annuus* Linné (girassol) reveladas pelo ensaio do micronúcleo.** 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - UNIFENAS, Alfenas, 2012.



TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos** : introdução ao estudo dos antimicrobianos. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996.

THOMAS, P; UMEGAKI, K; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, Swansea, v. 18, n. 2, p. 187–194, mar. 2003.

TREVINO, A. V. *et al.* Enhanced topoisomerase II targeting by annamycin and related 4-demethoxy anthracycline analogues. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v. 3, n. 11, p. 1403–1410, nov. 2004.

UEMURA, T. *et al.* DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. **Cell**, Cambridge, v. 50, n. 6, p. 917–925, sept. 1987.

UEMURA, T; YANGIDA, M. Mitotic spindle pulls but fails to separate chromosomes in type II DNA topoisomerase mutants: uncoordinated mitosis. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, London, v. 5, n. 5, p. 1003–1010, may 1986.

UNESCO. **Comissão de ética no uso de animais, Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO)** – Bruxelas- Bélgica, 1978.

VAN ACKER, F. A. A. *et al.* WJF. 7-Monohydroxyethylrutoside protects against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 6, n. 4, p. 1337–1341, apr. 2000.

VAN ACKER, S. A. *et al.* Monohydroxyethylrutoside as protector against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 115, n. 7, p. 1260–1264, aug. 1996.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 27, n. 1, p. 1–7, ago. 2006.

VENKATESH, P. *et al.* Modulation of Doxorubicin-Induced Genotoxicity by *Aegle marmelos* in Mouse Bone Marrow: A Micronucleus Study. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 6, n. 1, p. 42–53, mar. 2007.

VIDHYA, N; DEVRAJ, S. N. Antioxidant effect of eugenol in rat intestine. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 37, n. 12, p. 1192–1195, dec. 1999.

WEISS, R. B. Toxicity of chemotherapy: the last decade. **Seminars in Oncology**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 86–97, feb. 2006.

YAMAMOTO, K. I; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and poisons. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 127–131, jun. 1980.

YANAGIDA, M; STERNGLANZ, R. Genetics of DNA topoisomerases. In: COZZARELLI, N. R; WANG, J. C. **DNA Topology and Its Biological Effects**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. p. 299–320.

YOUNG, R. C; OZOLS, R. F; MYERS, C. E. The anthracycline antineoplastic drugs. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 305, n. 3, p. 139–153, jul. 1981.

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

ZWEIER, J. L. Reduction of O<sub>2</sub> by iron-adriamycin. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 10, p. 6056–6058, may 1984.


## **7. ANEXOS**



**PARECER N.º04A/2008**

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP, da UNIFENAS, Setor de Experimentação Animal, tendo analisado, nesta data, o protocolo do projeto de pesquisa intitulado, **Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade dos extratos hidroalcoólicos de fitoterápicos usando os ensaios do micronúcleo e do cometa em medula óssea e sangue periférico de roedores *in vivo***, de autoria do Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, resolveu enquadrá-lo na categoria de aprovado para fins de início da pesquisa.

Alfenas, 25 de Abril de 2008.

  
**Prof. Helena Engel Velano**  
Coordenadora do CEP



## DECLARAÇÃO DE REVISÃO ORTOGRÁFICA

Declaro que a Dissertação de Mestrado, do curso de pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal, da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, intitulada “**Evidências simultâneas de ausência de genotoxicidade e anti genotoxicidade de *Zizyphus joazeiro* Mart. (raspa-de-juá) usando o ensaio do micronúcleo**”, e desenvolvida pela aluna Juliana Yoshida Públio, sob orientação do Prof. Dr. João Evangelista Fiorini e do Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, passou pelo processo de edição e correção ortográfica.

Alfenas, 16 de Julho de 2013.



---

**Everton Luiz Marquez**  
Jornalista – Mtb: MG 07736 JP  
RG M6830161 - Tel.(35) 3292-1442

## **8. ARTIGO CIENTÍFICO**

**Reduction of the DOX-induced genotoxic effects and nonmutagenic effects of *Ziziphus joazeiro* mart. revealed by micronucleus assays**

Marcelo Fabiano Gomes Boriollo <sup>a,b,\*</sup>, Marielly Reis Resende <sup>d</sup>, Thaísia Andrielle da Silva <sup>a,b</sup>, Juliana Yoshida Públio <sup>b</sup>, Luiz Silva Souza <sup>a,b</sup>, Carlos Tadeu dos Santos Dias <sup>d</sup>, Nelma de Mello Silva Oliveira <sup>a,c</sup>, João Evangelista Fiorini <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Farmacogenômica e Biologia Molecular, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

<sup>b</sup> Centro de Pesquisa e Pós-graduação em Ciência Animal, Área de Patologia e Farmacologia Animal, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental, Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brasil.

<sup>d</sup> Departamento de Ciências Exatas, Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, Brasil.

---

\* **Corresponding Author.** Laboratório de Farmacogenômica e Biologia Molecular, Faculdade de Ciências Médicas & Centro de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS). Rod. MG 179, Km 0 - *Campus* Universitário - CEP: 37130-000 - Alfenas, MG, Brasil. Tel.: +55 35 3299-3255.

E-mail address: marcelo.boriollo@unifenas.br (Dr. M.F.G. Boriollo).

## Abstract

The therapeutic activity of *Ziziphus joazeiro* Mart. (raspa-de-Juá) has been demonstrated from some studies, such as, antifungal, antibacterial, antipyretic and antioxidant properties. The aim of this research was to evaluate the mutagenicity of glycolic extract of *Z. joazeiro* Mart. (GEZJ) barks using the micronucleus assay in bone marrow of mice (heterogenetic *Swiss albinus* – Unib: SW). The interaction between GEZJ and the genotoxic effects of doxorubicin (DOX) was also analysed. Experimental groups were evaluated after 24-48 h of treatment with N-Nitroso-N-ethylurea (NEU) and DOX (positive controls), NaCl (a negative control) and GEZJ (500-2,000 mg.Kg<sup>-1</sup>). Anti-mutagenic assays were carried out using the GEZJ in combination with these positive controls (GEZJ+NEU and GEZJ+DOX). The number of polychromatic erythrocytes (PCEs), the number and frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs), and the ratio of polychromatic erythrocytes and monochromatic (PCE/NCE) were reported and submitted to one-way analysis of variance (ANOVA), using a factorial scheme of  $9 \times 2 \times 2$  (treatment  $\times$  gender  $\times$  time), and medium comparison with Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ). The frequency of MNPCEs was significantly different ( $p < 0.05$ ) between (i) the positive and negative control treatments, (ii) the positive controls and animals treated with GEZJ and (iii) animals treated with positive controls (NEU or DOX) and GEZJ combined with these positive controls. There was no mutagenicity (clastogenicity/aneugenicity) observed in GEZJ regardless of the dose and time, but a variable response was observed among genders of mouse. The anti-mutagenic effects of GEZJ suggest a potential protective mechanism against DOX-induced genotoxic effects.

**Keywords:** *Zizyphus joazeiro* Mart. (raspa-de-Juá), doxorubicin, micronucleus assay, bone marrow, rodent, mutagenicity and anti-mutagenicity.



## Introduction

Research involving medicinal plants and their extracts has been on the rise in health care due to its easy acceptability, availability and low cost. A considerable portion of the world population uses traditional medicine for their primary health care, and it is presumed that most of this traditional therapy involves the use of plant extracts or their biologically active components (Farnsworth et al., 1985; Kaur et al., 2005). Only approximately 8% of the 100,000 species catalogued in Brazil have been characterized for their chemical properties, and it is estimated that only 1,100 species have been evaluated for therapeutic purposes (Garcia et al., 1996). A Brazilian pharmaceutical survey reveals an expense of approximately two to three billion dollars a year on import of raw materials used in the production of medicines. Still, this survey shows that 84 % of medicines consumed in the country come from imports and 78-80% of the drugs produced come from multinational companies (Bermudez, 1995; Miguel and Miguel, 1999); these statistics justify the search for alternatives to overcome the international dependence of the Brazilian chemical-pharmaceutical industry.

In addition, many species of medicinal plants (e.g., *Ziziphus joazeiro*, *Ruta graveolens*, *Mentha x villosa*, *Amburana cearensis*, *Plectranthus amboinicus*, *Anadenanthera colubrina*, *Ximenia americana* and *Myracrodruon urundeuva*) are also popularly used by communities located in the region of the Brazilian Caatinga to treat a wide spectrum of clinical conditions ranging from diseases by various palliative cares or general aches (i.e., bronchitis, sinusitis, rhinitis, nasal congestion, headaches, flu, fever, expectorant, colic, hypertension, thrombosis, indigestion, intestinal, liver and kidney problems, infectious and inflammatory processes, pains in general, among others) (Cartaxo et al., 2010). *Z. joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) is a tree native resistant to dry (Cartaxo et al., 2010), representing a source of water and food for the animals in extreme conditions of dryness (Caldas, 1960; Cruz, 1985; Nunes et al., 1987).

The phytochemical composition *Z. joazeiro* Mart. revealed a rich content on *n*-alkanes (78.6%) in their leaf epicuticular wax, the more efficient constituent against the permeability of water, and the presence of triterpenoids (Oliveira et al., 2003). In other phytochemical investigation of antimicrobial compounds, from the dichloromethane extract of *Z. joazeiro* Mart. barks, demonstrated the existence of triterpenoids with weak antibacterial activity (i.e., betulinic, alphitolic and ursolic acids) and remarkable activity against *Staphylococcus epidermidis* [i.e., betulinic acid ester derivatives: 7 $\beta$ -(4-hydroxy-benzoiloxi), 7 $\beta$ -(4-hydro-3-

methoxy-benzoiloxi) and 27-(4-hydroxy-3-methoxy-benzoiloxi)] (Schuhly et al., 1999). The *Z. joazeiro* Mart. bark also shows abundance of saponins, which has been used as toothpastes, whose aqueous extract showed antimicrobial action against bacteria (planktonic cells and biofilms artificial) related to dental caries and periodontal diseases (Alviano et al., 2008). Other popular therapeutic applications of *Z. joazeiro* Mart. [i.e., treating dandruff, rheumatism, teeth cleaning, flu, fever, chronic bronchitis, gastric ulcers, indigestion, heartburn and headaches (Shuhly et al., 1999; Cartaxo et al., 2010)] and some scientific experimental [i.e., potential antifungal (Cruz et al., 2007), antibacterial (Alviano et al., 2008; Leal et al., 2010; Shuhly et al., 1999), antioxidant (Alviano et al., 2008), antipyretic (Nunes et al., 1987) and low toxicity (Alviano et al., 2008)] were reported.

Biologically active compounds have been recognized for their pharmacological properties, but many of these compounds cannot be introduced as therapeutic agents due to their toxicological, carcinogenic and mutagenic properties (Ames, 1983; Konstantopoulou et al., 1992; Tavares, 1996). In drug development, the analysis of genotoxicity assays represent a considerable effort, as most pharmaceutical organizations evaluate a new therapeutic agent based on *in vitro* and *in vivo* data genotoxic (Purves et al., 1995). In this context, tests to evaluate the mutagenic activity of the plants used by the population as well as their isolated compounds are necessary and important for establishing control measures in widespread use. Furthermore, it is necessary to clarify the mechanisms and conditions that mediate the proposed biological effect before plants are considered as therapeutic agents (Varanda, 2006).

The genotoxic effects of a potential mutagen depend on its cellular target(s). Some chemicals need to be metabolized before acquiring their mutagenic capacity (Mateuca et al., 2006). Mutagens can induce genomic changes by directly or indirectly targeting DNA or by binding to proteins involved in the maintenance of genome integrity (Kirsch-Volders et al., 2003). The consequences of mutagen-target interactions may lead to different types of DNA damage (DNA adducts, alkali-labile sites, strand breaks) and mutations ranging from single nucleotide changes (gene mutations) to structural (chromosome mutations) or numerical chromosome changes (genome mutations). The fate of the cell is ultimately determined by whether the various lesions inflicted on the genome are repaired or eliminated by apoptosis (Decordier et al., 2002).

As far as genotoxicity studies are concerned, the *in vivo* micronucleus (MN) assay in rodent bone marrow plays a crucial role in the test battery aimed at identifying hazardous mutagens (Mateuca et al., 2006); this assay is especially suited to assessing mutagenic hazards because it allows consideration of multiple factors, such as *in vivo* metabolism,

pharmacokinetics and DNA repair processes, even though these processes vary among species, among tissues and among genetic endpoints (OECD, 1997a, b; Ribeiro et al., 2003). Because a bone marrow erythroblast develops into a polychromatic erythrocyte (PCE) (i.e., cell generated by the extrusion of its main nucleus), any micronucleus that has been formed may remain behind in the otherwise anucleated cytoplasm. Thus the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) has been the principal endpoint for MN assays. Furthermore, the measurement of MNPCEs in peripheral blood has been equally amenable to any species in which the inability of the spleen to remove micronucleated erythrocytes has been demonstrated, or which has shown an adequate sensitivity to detect agents that cause structural or numerical chromosome aberrations. Positive results (i.e., an increase in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes in treated animals) indicate that a substance causes the formation of micronuclei, which are the result of chromosomal damage or damage to the mitotic apparatus in the erythroblasts of the test species, whereas negative results indicate that, under the test conditions, the test substance does not cause the formation of micronuclei in the immature erythrocytes of the test species. Nevertheless, the number of normochromatic erythrocytes (NCE) in the peripheral blood that contain micronuclei among a given number of mature erythrocytes can also be used as the endpoint of this assay (OECD, 1997c; Ribeiro et al., 2003). In addition, understanding the genotoxic effects induced by phytotherapeutics by and foods by employing the mammalian *in vivo* MN assay has been the goal of several researchers groups (Alves et al., 2012; Chandrasekaran et al., 2011; Indart et al., 2007; Silva et al., 2011; Venkatesh et al., 2007).

Micronuclei (MN) are small, extranuclear bodies that arise in dividing cells from acentric chromosome fragments, chromatid fragments, whole chromosomes, or whole chromatids that lag behind in anaphase and are not included in the daughter nuclei in telophase (Fenech and Morley, 1985). Micronuclei harboring chromosomal fragments may result from direct double-strand DNA breakage, conversion of single-strand breaks (SSBs) into double-strand breaks (DSBs) after cell replication, or the inhibition of DNA synthesis. The misrepair of two chromosome breaks may lead to an asymmetrical chromosome rearrangement, producing a dicentric chromosome and an acentric fragment. Frequently, the centromeres of the dicentric chromosomes are pulled to opposite poles of the cells at anaphase; this results in the formation of a nucleoplasmic bridge (NPB) between the daughter nuclei and an acentric fragment that lags behind to form a MN (Fenech et al., 2005; Thomas et al., 2003). Micronuclei harboring whole chromosomes are primarily formed from defects in the chromosome segregation machinery, such as deficiencies in the cell cycle-controlling

genes; the failure of the mitotic spindle, kinetochore, or other parts of the mitotic apparatus; or by damage to chromosomal substructures, mechanical disruption (Albertini et al., 2000) and hypomethylation of centromeric DNA (Fenech, et al., 2005). Micronuclei can also arise by gene amplification via breakage-fusion-bridge (BFB) cycles where amplified DNA is selectively localized to specific sites at the periphery of the nucleus and eliminated via nuclear budding (NBUD) during the S-phase of the cell cycle (Fenech, 2002). The fate of MN after their formation in the micronucleated cell is poorly understood. Their post-mitotic fate includes: (i) elimination of the micronucleated cell by apoptosis (Decordier et al., 2002), (ii) expulsion from the cell (when the DNA within the MN is not expected to be functional or capable of replication due to the absence of the necessary cytoplasmic components); (iii) reincorporation into the main nucleus (after which the reincorporated chromosome may be indistinguishable from those of the main nucleus and may resume normal biological activity); or (iv) retention within the cell's cytoplasm as an extra-nuclear entity (after which MN may complete one or more rounds of DNA and chromosome replication) (Leach and Jackson-Cook, 2004).

Despite others studies supporting the potential therapeutic effectiveness of *Z. joazeiro* Mart., an inexistence of investigations aimed at understanding the genotoxic and mutagenic effects have been observed so far. To contribute to the information on the genotoxic potential of herbal extracts, the present study evaluated the mutagenic effects of glycolic extract of *Z. joazeiro* Mart. barks. The effect of the maximum permissible concentration of *Z. joazeiro* Mart. on the doxorubicin (DOX)-induced genotoxic effects in mice bone marrow was also studied (i.e., an evaluation of the anti-mutagenic properties).

## Material and Methods

### *Phytotherapeutics*

Glycolic extract of *Z. joazeiro* Mart. barks (GEZJ) was purchased commercially and stored according to the manufacturer's recommendations (AKSY Comercial Ltda., cat. # 0000000, São Bernardo do Campo, SP, Brazil). The extract was subjected to an alcoholic extraction process in a Rotary Evaporator (Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., mod. MA-120, Piracicaba, SP, Brazil) and their mass and relative densities were determined by the pycnometer method (Farmacopéia Brasileira ANVISA/FIOCRUZ, 2010).

### *System - Test in vivo*

Healthy, heterogeneous, young adult male and female *Swiss albinus* (Unib: SW) mice (between 7 and 12 weeks - pubescent period), with a body weight between 30 g and 40 g (i.e., the variation weight between the animals, for each sex, should not exceed the  $\pm 20\%$  of medium mass) were provided by CEMIB (*Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório* – UNICAMP; <http://www.cemib.unicamp.br>), and erythrocytes from the bone marrow of these mice were used in the micronucleus assay (Chorilli et al., 2007; CSGMT, 1986).

The animals were kept in groups of the same sex, in polypropylene boxes, in an air-conditioned environment to  $22^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$ , with relative air humidity of  $50\% \pm 20\%$ , and with 12-hour day-night cycles (i.e., 12h light and 12h dark). These were fed with Purina<sup>®</sup> Labina commercial rations (Nestlé Purina Pet Care Company) and water *ad libitum*, and acclimated to laboratory conditions for 7 days (a trial period) before the execution of the experiment. At the end of the trial period, each animal was weighed and, according to the weight, received 100  $\mu\text{L}$  of the indicated liquid [150 mM NaCl in water for injection, GEZJ (administered after alcoholic extraction), NEU, or DOX] for every 10 g of body mass.

Each animal was properly identified by its tail using numerical markings to ensure the continuity of the records and of the interpretations throughout the study (OECD, 1997c). After the experimental treatment, the animals were euthanized by inhalation of carbon dioxide in adapted acrylic chambers (as described in the Report of the American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia, 2000). The contaminated material was packaged in double plastic bags and stored in specific locations until the moment of its incineration, in accordance with the safety and health standards of the institution. This research was conducted in accordance with the Universal Declaration of Animal Rights (UNESCO, 1978), the ethical principles in Animal experimentation (*Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* – COBEA), the Brazilian Environmental Crimes Law (*Lei N<sup>o</sup> 9.605 de 12 de Fevereiro de 1998*), the Brazilian standards for Didactic-Scientific Practice of Vivisection of Animals (*Lei N<sup>o</sup> 6.638 de 8 de Maio de 1979*), and with the approval of the Committee of Ethics in Research Involving Animals of UNIFENAS (CEPEAU Protocol No. 04A/2008).

### *Experimental Groups*

Experimental groups (consisting of 3 males and 3 females each) were assessed after 24 and 48 hours of single treatment administered by gavage (experimental mutagenic test groups: 7-14; anti-mutagenic test experimental groups: 15-18), according to the previously established methodology (OECD, 1997c). Negative control groups (1 and 2) and positive control groups (3, 4, 5 and 6) were also included in single treatments administered intraperitoneally (Figure 1).

#### *Processing the bone marrow*

Micronucleus assays using erythrocytes from the bone marrow of mice were performed 24 and 48 hours after treatment, using the methodology described previously (Schmid, 1976; Zambrano et al., 1982). Shortly after euthanasia, the femora were surgically and aseptically removed, and the animals appropriately discarded. Each femur was sectioned at the proximal end and the contents of the spinal canal were washed with 1.5 mL of 150 mM NaCl solution and transferred to a 15 mL centrifuge tube.

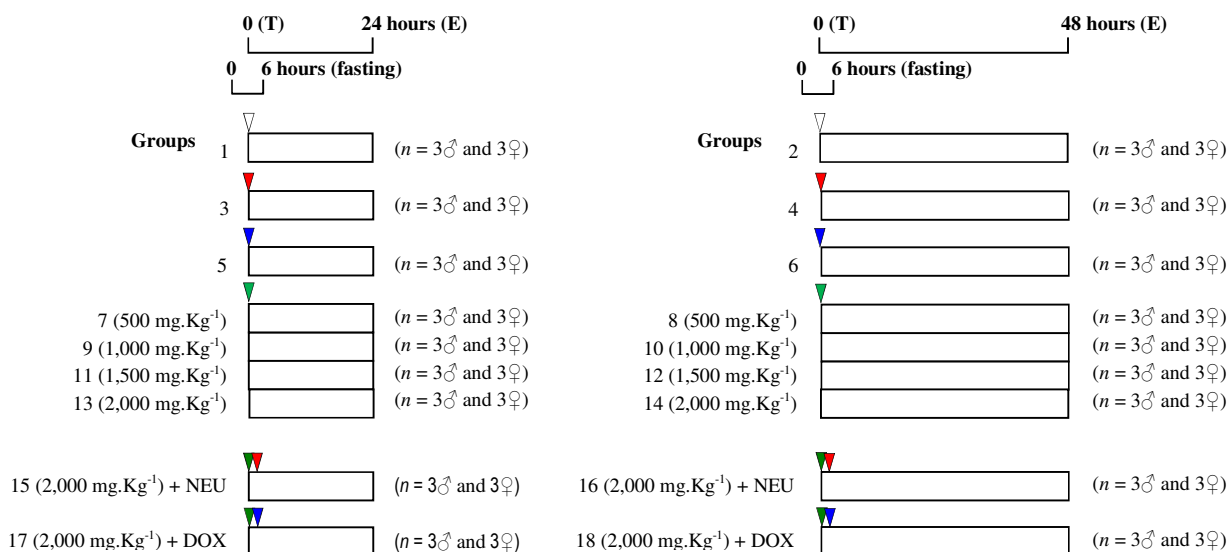
This material was resuspended with a Pasteur pipette to ensure a random distribution of bone marrow cells. The suspension was then centrifuged at 1,000 rpm (Centrífuga de Bancada Microprocessada, Mod. NT 810, Nova Técnica Ind. e Com. de Equip. para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brazil) for 5 minutes. The resulting sediment was resuspended in 500  $\mu$ L of a 150 mM solution of NaCl then 4% formol was added and the supernatant was discarded. The slides were prepared by smearing (2 blades per animal), dried at room temperature for 24 h and stained in coloration tub containing Leishman's eosin methylene blue dye [pure dye for 3 min, followed by diluted dye in distilled water (1:6) for 15 min] to differentiate polychromatic erythrocyte (PCE) from monochromatic erythrocyte (NCE).

Polychromatic erythrocytes (PCEs) were observed at a magnification of 1000 $\times$  using optical microscopy (Nikon Eclipse E-200), counted (2000 polychromatic erythrocytes anucleated per animal) with the aid of a digital cell counter (Contador Diferencial CCS02, Kacil Indústria e Comércio Ltda., PE, Brasil Contador Diferencial CCS02, Kacil Indústria e Comércio Ltda., PE, Brazil) and photographed using an 8.1 Megapixel Digital Camera (DC FWL 150). The number of polychromatic erythrocytes (PCEs), the number and frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs), and the ratio of polychromatic erythrocytes and monochromatic (PCE/NCE) were reported.

### Statistical Analysis

The data obtained in the micronucleus assay were submitted to *one-way* analysis of variance (ANOVA), using a factorial scheme of  $9 \times 2 \times 2$  (treatment  $\times$  gender  $\times$  time), and medium comparison with Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ) using SAS<sup>®</sup> version 9.2 computer software.

**Figure 1.** Experimental protocol for the mutagenic and anti-mutagenic assays using glycolic extract of *H. annuus* L. *Z. joazeiro* Mart. barks.



▽ 150 mM NaCl

▼ N-Nitroso-N-ethylurea 50 mg.Kg<sup>-1</sup> – NEU (Sigma N8509)

▼ Doxorubicin Hydrochloride 5 mg.Kg<sup>-1</sup> – DOX (Eurofarma Laboratórios Ltda., ref. # L83608)

▼ Glicolic Extract of *Z. joazeiro* Mart. barks – GEZJ (administered after alcoholic extraction)

T (Treatment)

E (Euthanasia)

n (number of mice)

## Results and Discussion

Researches involving medicinal plants contribute important information to the new discoveries and the development of potential chemotherapeutics and help establish safe measures for the popular use or appropriate dosage (Arora et al., 2005; Elgorashi et al., 2003). According to the popular therapeutic applications, *Z. joazeiro* Mart. has been used for treating dandruff, rheumatism, teeth cleaning, flu, fever, chronic bronchitis, gastric ulcers, indigestion, heartburn and headaches (Shuhly et al., 1999; Cartaxo et al., 2010). In addition, *Z. joazeiro* demonstrated potential antifungal (Cruz et al., 2007), antibacterial (Alviano et al., 2008; Leal et al., 2010; Shuhly et al., 1999), antioxidant (Alviano et al., 2008), antipyretic (Nunes et al., 1987) and low toxicity (Alviano et al., 2008). This information partly support the popular use of *Z. joazeiro* for certain treatments and collaborate with the ethnopharmacological researches in selecting plants for bioactivity screening (Cruz et al., 2007). However, studies aimed at understanding the mutagenic and genotoxic effects of *Z. joazeiro* Mart. were not found so far, which drove us to evaluate the harmful mutagenic (i.e., clastogenicity and/or aneugenicity) and anti-mutagenic properties of glycolic extract of *Z. joazeiro* Mart. barks using the MN assay *in vivo*. The MN assay is an effective cytogenetic end point in assessing the damage induced by chemical mutagens and carcinogens (Heddle et al., 1981, 1983; Yamamoto and Kikuchi, 1980). The formation of micronuclei and the incidence of chromosomal aberrations are highly correlated (Almassy et al., 1987; Heddle et al., 1983). Among the various techniques used to detect genetic and genotoxic effects, the MN test is simple, inexpensive, and less cumbersome than other methods and allows convenient and easy application; this is particularly true for genotoxic studies (Heddle et al., 1983; Schmid, 1975).

The numbers and frequencies of MNPCEs and the PCE/NCE ratio in the bone marrow of mice were analyzed statistically for each one of the treatments: positive and negative controls, mutagenic assay and anti-mutagenic assays. Animals treated with GEZJ (mutagenic assays) or GEZJ combined with the positive controls (anti-mutagenic assays) showed no significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatment times (24 h and 48 h), but such statistical differences were observed among genders of mice. However, the analysis of the MNPCEs numbers and frequencies revealed significant differences ( $p < 0.05$ ) between the three control treatments (i.e., NaCl *Tukey groups D and D'*, NEU *Tukey groups B and B'* and DOX *Tukey groups A and A'*). Likewise, these differences were observed between the positive controls and experimental mutagenic treatments (i.e., NEU *Tukey groups B and B'*, DOX *Tukey groups A and A'* and 500-2,000 mg.Kg<sup>-1</sup>



<sup>1</sup> of GEZJ *Tukey groups CD-D and CD'-D'*), or between the positive controls and experimental anti-mutagenic treatments (i.e., 2,000 mg.Kg<sup>-1</sup> of GEZJ + 5 mg.Kg<sup>-1</sup> of DOX *Tukey groups CD and CD'* or 2,000 mg.kg<sup>-1</sup> of GEZJ + 50 mg.Kg<sup>-1</sup> of NEU *Tukey groups C and C'*). Therefore, animals treated with NaCl (negative controls), GEZJ (mutagenic assays) and GEZJ combined with the positive controls (anti-mutagenic assays) showed no significant differences ( $p < 0.05$ ) (Table 1). These results suggest the following: (i) There is no genotoxicity (clastogenicity or aneugenicity) of GEZJ, regardless of the dose of phytotherapeutic administration (500-2,000 mg.Kg<sup>-1</sup>) or the treatment time (24 h and 48 h), but a response variable was observed in the gender of the animal (male and female), and this is supported by the observation of spontaneous genetic changes in the negative control groups (150mM NaCl); (ii) There is a high genotoxicity (clastogenicity or aneugenicity) in DOX-treated animals given a dose of 5 mg.Kg<sup>-1</sup> [i.e., dosage above that which would be administered chemotherapeutically in humans: 0.55 to 1.25 mg.Kg<sup>-1</sup> considering individuals of 90 and 40 Kg (50 mg.ampula<sup>-1</sup>), respectively; from 0.11 to 0.25 mg.Kg<sup>-1</sup> considering individuals of 90 and 40 Kg (10 mg.ampula<sup>-1</sup>), respectively], whose MNPCE frequencies were significantly above those observed in the positive NEU control (50 mg.Kg<sup>-1</sup>) MN assay, regardless of the treatment time (24 h and 48 h) and the gender of the animal; (iii) There is evidence of anti-mutagenic effects (anti-clastogeny and/or anti-aneugeny) when GEZJ (2,000 mg.Kg<sup>-1</sup>) is administered in combination with the chemotherapy agent DOX (5 mg.Kg<sup>-1</sup>), that is, the GEZJ can contain phytochemical properties against the DOX-induced genotoxic effects in the bone marrow of mice.

In addition, the analysis obtained from the PCE/NCE ratio showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between the positive (NEU *Tukey group C''* and DOX *Tukey group BC''*) and negative controls (i.e., NaCl *Tukey group A''*). Significant differences were not observed between the negative controls (NaCl *Tukey group A''*) and animals treated with GEZJ combined with the chemotherapeutic agent DOX (GEZJ + DOX *Tukey group A''*), as well as significant differences were not observed between the animals treated with GEZJ (500-2,000 mg.Kg<sup>-1</sup> *Tukey group BC''*), the positive controls (NEU and DOX) and GEZJ combined with the NEU (GEZJ + NEU *Tukey group BC''*). These results suggest a systemic toxicity of GEZJP regardless of the dose (500-2,000 mg.Kg<sup>-1</sup>), treatment time (24 h and 48 h) and gender of the animal, as supported by the observation of toxicity of NUE, and a systemic toxicity of DOX under dosage of 5 mg.Kg<sup>-1</sup> regardless of the treatment time (24 h and 48 h) and gender of the animal. This observation also suggests that GEZJ can contain phytochemical properties against the DOX-induced toxic effects in the bone marrow of mice, as well as its own toxic effects can be neutralized in that

combination (GEZJ + DOX). However, a possible absence of the toxicity of this combination (DOX + GEZJ) placing doses  $\leq 500 \text{ mg.Kg}^{-1}$  of GEZJ, remains an intriguing question to be explored.

The acute toxicity of the extracts of some plants, including *Z. joazeiro* Mart., was determined from a single oral dose of plant extract ( $1\text{-}5 \text{ g.Kg}^{-1}$ ) in several groups of mice (i.e., each group consisting of four male and four female animals). Other behavioral parameters, including seizures, hyperactivity, sedation, grooming, loss of reflexes, breathing increased or decreased, water and food intake were also analyzed (Alviano et al., 2008). No body mass loss was observed after a period of 14 days. The treated mice showed no behavioral changes and a DL50 corresponding to variations between  $2.0\text{-}3.5 \text{ g.Kg}^{-1}$  was obtained. Those statements did not provide lethal to mice in doses tested and your data from *in vivo* assay indicate low toxicity (Alviano et al., 2008). Our results corroborate with these recent findings because the existence of systemic toxicity of *Z. joazeiro* Mart. in male and female mice, after 24 h (acute effect) and 48 h (chronic effect) treatments, regardless of the dose ( $500\text{-}2,000 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ).

The genotoxicity of anticancer drugs is of special interest because of the risk of inducing secondary malignancies. Patients undergoing treatment with chemotherapeutic agents for multiple myeloma, Hodgkin disease, and ovarian tumours are at risk for the development of secondary tumours after the completion of treatment (Canellos et al., 1975; Casciato and Scott, 1979; Ferguson and Pearson, 1996). The use of cytoprotective agents represents an alternative method for reducing radiotherapeutic and chemotherapeutic toxicity in normal tissues (Hospers et al., 1999), thus reducing the risk of potentially genotoxic effects such as secondary tumour formation (Ferguson and Pearson, 1996). For those agents whose maximum tolerated dose is limited primarily by myelosuppression, several strategies are being evaluated to permit dose escalation in the hope of obtaining better clinical results with the currently available chemotherapeutic drugs (Venkatesh et al., 2007).

Doxorubicin (DOX) is an important anthracyclines anticancer agent. It is a valuable component of various chemotherapeutic regimens for breast carcinoma and small-cell lung carcinoma. In metastatic thyroid carcinoma, DOX is most likely the best available agent (Venkatesh et al., 2007). DOX is also an important agent for the successful treatment of Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphomas (Young et al., 1981). A clear dose-response relation for DOX in several curative regimens has been shown, and decreased doses result in inferior survival rates (Hitchcock-Bryan et al., 1986), whereas an increase in DOX dose is limited because of severe cardiotoxicity, a major problem in the clinical application of DOX.

There is a large body of evidence to show that the dominant cellular target of DOX is DNA (Myers, 1998). The anthracyclines are classified as topoisomerase II inhibitors because they effectively stabilize the cleavage complex of this enzyme. Topoisomerase II plays an important roles in the segregation of newly replicated parts of intertwined chromosomes (Holm et al., 1985; Uemura and Yanagida, 1986), the condensation and decondensation of chromosomes, and the supercoiling of intracellular DNA (Uemura et al., 1987; Yanagida and Sternglanz, 1990). DNA topoisomerase II catalyzes the breakage and rejoining of both DNA strands, relaxes the superhelical twist, and catenates or decatenates circular DNA. DNA topoisomerase II performs these topological transformations by transporting one double stranded DNA segment through an enzyme-mediated transient double-strand break in another. The several DNA strands are rejoined after completion of the above process (Liu et al., 1980). The most readily detectable genotoxic effect of topoisomerase-targeting agents in somatic cells is the formation of a ternary complex containing the drug, thus stabilizing the DNA double-strand breaks (Anderson and Berger, 1994). DOX is a potent DNA topoisomerase II inhibitor, and it stabilizes DNA double-strand breaks and does not allow them to rejoin, leading to cell death (Del Bino et al., 1991; Kaufmann, 1989; Trevino et al., 2004). These DNA double-strand breaks may subsequently lead to chromosomal breaks that finally may lead to the production of MN following cell division (Natarajan et al., 1986). The persistence of DNA lesions in DOX-treated cells has been confirmed by MN assay. The incidence of micronuclei showed a dose response in large-scale screening for suspected clastogens (Heddle et al., 1983). The antitumor activity of anthracyclines is consistent with their ability to interact with cellular DNA, and this noncovalent interaction can inhibit the function of DNA ligases, helicases, and other DNA-dependent proteins, in addition to topoisomerase II. However, their cellular effects are by no means limited to this type of enzymatic inhibition. DOX exhibits a wide range of cellular effects, and it is likely that no single mechanism of action will account for all of the observed clinical and cellular responses (Myers, 1998; Weiss, 2006). DOX forms a stable complex with ferric iron, which reacts with oxygen, forming superoxide anions, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals. DOX is known to cause single-strand DNA breaks, chromosomal rearrangements, and mutational events, and it is a potent carcinogen (Zweier, 1984). DOX has been reported to induce micronuclei, chromatid and chromosome aberrations, and DNA single- and double-strand breaks *in vitro* and *in vivo* (Al-Harbi, 1993; Al-Shabanah, 1993; Bean et al., 1992; Delvaeye et al., 1993; Dhawan et al., 2003; Jagetia and Aruna, 2000; Jagetia and Nayak, 1996, 2000; Shan et al., 1996). The major acute toxicity induced by DOX is bone marrow suppression, and the long-term clinical usefulness is limited

by a cumulative dose-dependent irreversible chronic cardiotoxicity, which manifests itself as congestive heart failure or cardiomyopathy (Van Acker et al., 1995, 2000).

Therefore, it is essential to screen for newer pharmacological agents that can protect the normal cells against DOX-induced cumulative toxicity. Many plants that have been widely used in traditional medicine are less toxic than pharmaceutical agents and have recently attracted the attention of researchers around the world. Plants contain many compounds, and it is likely that these can provide better protective effects than a single molecule (Vidhya and Devraj, 1999). The presence of many molecules in plants may be advantageous, as some of them may counteract the toxicity of others, and as a result, the net effect may be beneficial for therapeutic purposes. For example, the effect of various concentrations (200, 250, 300, 350, and 400 mg/kg body weight) of *Aegle marmelos* on the doxorubicin (DOX)-induced genotoxic effects in mice bone marrow was studied (Venkatesh et al., 2007). Treatment of mice with different concentrations of DOX (5, 10, or 15 mg.kg<sup>-1</sup> body weight) resulted in a dose-dependent elevation in the frequency of micronucleated polychromatic and normochromatic erythrocytes in mouse bone marrow, and it was accompanied by a DOX dose-dependent decline in the PCE/NCE ratio. The treatment of mice with *Aegle marmelos*, orally once daily for 5 consecutive days before DOX treatment, significantly reduced the frequency of DOX-induced micronuclei and significantly increased the PCE/NCE ratio at all scoring times. This observed chemoprotective effect may be due to the sum total of interaction between different ingredients of this complex mixture. The degree of protection may depend on the interaction of components individually or collectively with the genotoxic agent. The plausible mechanisms of action of *Aegle marmelos* in protecting against DOX-induced genomic insult were scavenging of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and <sup>•</sup>OH and other free radicals, increase in antioxidant status, restoration of topoisomerase II activity, and inhibition of the formation of DOX-iron complex (Venkatesh et al., 2007). Another study was undertaken to evaluate the genotoxic potential of *Copaifera lansdorffii* Desf. leaf hydroalcoholic extract and its influence on the genotoxicity induced by chemotherapeutic agent doxorubicin (DOX) using the Swiss mouse peripheral blood micronucleus test. The results of this study demonstrated that *C. lansdorffii* Desf. was not itself genotoxic and that in animals treated with *C. lansdorffii* Desf. and DOX, the number of micronuclei was significantly decreased compared to animals receiving DOX alone. The putative antioxidant activity of one or more of the active compounds of *C. lansdorffii* Desf., including two major flavonoid heterosides (quercitrin and afzelin), may explain the effect of this plant on DOX genotoxicity (Alves et al., 2012). Evidence of nongenotoxic effects and a reduction of the

DOX-induced genotoxic effects of sunflower seeds (*Helianthus annuus* Linné) were also revealed by micronucleus assays in mouse bone marrow (Boriollo et al., 2013). The results of this study suggested that there were no mutagenicity (clastogeny and/aneugeny) in tincture and oil (food and pharmaceutical) of sunflowers seeds regardless of the dose (250-2,000 mg.Kg<sup>-1</sup>), time (24-48 h) (except food oil) and gender of the mice (except food and pharmaceutical oils). The moderate anti-mutagenic effects of tincture of sunflowers seeds suggested a potential slight protective mechanism against DOX-induced genotoxic effects (Boriollo et al., 2013).

The PCE/NCE ratio is an indicator of the acceleration or inhibition of erythropoiesis. The PCE/NCE ratio has been reported to vary with scoring time, and a continuous decline in the PCE/NCE ratio may be due to the inhibition of cell division, the killing of erythroblasts, the removal of damaged cells, or dilution of the existing cell pool with newly formed cells (Venkatesh et al., 2007). Several mechanisms may have been responsible for the cytotoxicity of DOX and micronucleus induction (Gewirtz, 1999), including the intercalation of DOX into cellular DNA (Kiyomiya et al., 2001; Painter, 1978), the stabilization of the topoisomerase II–DNA complex (Guano et al., 1999; Pommier et al., 1985), free radical–mediated toxicity caused by redox cycling of the semiquinone radical (Bachur et al., 1979), or the formation of reactive oxygen species by the DOX-iron complex (ELIOT et al., 1984; Konorev et al., 1999; Myers, 1998). On the other hand, other chemicals such as captopril and desferrioxamine (Al-Harbi, 1993; Al-Shabanah, 1993),  $\beta$ -carotene and vitamins A, C, and E (Costa and Nepomuceno, 2006; Gulkac et al., 2004; Lu et al., 1996), thiol N-acetylcysteine, probucol, lovastatin, and hydrophilic flavonoids such as rutin and luteolin (Al-Gharably, 1996; Bardeleben et al., 2002; D'Agostini et al., 1998; Sadzuka et al., 1997) have also been reported to reduce DOX-induced MN, genotoxicity, and cytotoxicity. However, proponents of herbal medicine always claim that mixtures are better than pure chemicals because the dozens of biologically active compounds in plants work together to produce a greater effect than any one chemical on its own (Mackenzie, 2001).

## Conclusions

In conclusion, this research evaluated the genotoxic effects (clastogeny and aneugeny) of a glycolic extract of *Z. joazeiro* Mart. barks (GEZJ) using the MN assay in PCE in bone

marrow of *Swiss albinus* mice for the first time. The interaction between this extract and the genotoxic effects induced by DOX was also studied.

This study observed an absence of genotoxicity of GEZJ, regardless of dose (500-2,000 mg. Kg<sup>-1</sup>) and time (24-48 h), but a response variable was observed in the gender. A high genotoxicity of DOX was also observed from in animals treated with a dose greater than that administered to humans, compared to the genotoxicity of the positive control NEU used in the MN assay, regardless of the treatment time and gender of the animal. However, evidence of the anti-genotoxic effects of GEZJ when combined with DOX was observed. This fact suggested that the genotoxic effects induced by DOX in the bone marrow of mice are not uniform and that the GEZJ can contain phytochemical properties against the DOX-induced genotoxic effects. The PCE/NCE ratio in the animals treated with GEZJ revealed differences between the concentrations tested and negative controls, suggesting also a systemic toxicity regardless of the dose, treatment time and gender of the animal. This toxicity was also observed in the animals treated with DOX. However, a significant reduction in that toxicity was observed when animals were treated with a combination of GEZJ and DOX. This result suggested that GEZJ can contain phytochemical properties against the DOX-induced toxic effects and the toxic effects of GEZJ can be neutralized in the bone marrow of mice.

Finally, other studies involving the genotoxicity of *Z. joazeiro* Mart. bark extracts should be conducted [including mutagenicity assays with *Salmonella typhimurium* test (Ames test) as an indicator of potential carcinogenicity to mammals, gene mutation test in mammalian cells (mouse lymphoma assay), cytogenetic and aneuploidy tests *in vitro*, micronucleus test in cultured cells *in vitro*, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) test for mutagenesis, comet test to detect of DNA damage and repair in individual cells, and functional genomic and proteomic tests for mutagenesis (cDNA microarrays and other array analyses)], to characterize the potential effects genotoxic and anti-genotoxic mechanisms and, importantly, for the establishment of limits for human consumption, the delineation of potential risks to human health, and for rational strategies for implementing chemo-preventive measures.

### **Conflict of Interest**

The authors have declared no conflict of interest.

## Acknowledgements

This research was supported by *Rede Mineira de Ensaios Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos* (REDE MINEIRA TOXIFAR - 2012), *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG).

## References

1. Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z. (1985) Medicinal plants in therapy. Bull. World Health Organ., **63**, 965–981.
2. Kaur, S., Michael, H., Arora, S., Härkönen, P.L., Kumar, S. (2005) The *In vitro* cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. J Ethnopharmacol, **97**, 15–20.
3. Garcia, E. S. *et al.* (2002) Fitoterápicos. In: Simões, C.M.O. *et al.* (eds), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. (eds), UFRGS, Porto Alegre, pp.15.
4. Bermudez, J.A.Z. (2002) Indústria farmacêutica, estado e sociedade. In: Simões, C.M.O. *et al.* (eds) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. (eds), UFRGS, Porto Alegre, pp.15.
5. Miguel, M.D. and Miguel, O.G. (1999) *Desenvolvimento de fitoterápicos*. Probe Editorial, São Paulo.
6. Cartaxo, S.L., Sousa, M.M.A., Albuquerque, U.P. (2010) Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. J Ethnopharmacol, **13**, 326–342.
7. Caldas, R. (1987) Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. In: Nunes, P.H., Marinho, L.C., Nunes, M.L., Soares, E.O. *Antipyretic activity of an aqueous extract of Zizyphus joazeiro Mart. (Rhamnaceae)*. Braz. J. Med. Biol. Res., **20**, 599–601.
8. Cruz, G.L. (1987) Dicionário das plantas úteis do Brasil. In: PH Nunes, P.H., Marinho, L.C., Nunes, M.L., Soares, E.O. *Antipyretic activity of an aqueous extract of Zizyphus joazeiro Mart. (Rhamnaceae)*. Braz. J. Med. Biol. Res., **20**, 599–601.
9. Nunes, P.H.M., Marinho, L.C., Nunes, M.L.R.L., Soares, E.O. (1987) Antipyretic activity of an aqueous extract of *Zizyphus joazeiro Mart. (Rhamnaceae)*. Braz. J. Med. Biol. Res., **20**, 599–601.

10. Oliveira, A.F.M., Meirelles, S.T., Salatino, A. (2003) Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. An. Acad. Bras. Cienc., **75**, 431–439.
11. Schuhly, W., Heilmann, J., Calis, I., Sticher, O. (1999) New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. Planta Med., **65**, 740–743.
12. Alviano, W.S., Alviano, D.S., Diniz, C.G., Antonioli, A.R., Alviano, C.S., Faria, L.M., Carvalho, M.A.R., Souza, M.M.G., Bolognese, A.M. (2008) *In vitro* antioxidant potential of plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. Arch. Oral Biol., **53**, 545–552.
13. Cruz, M.C.S., Santos, A.M., Barbosa, Jr., De-Melo, D.L.F.M., Alviano, C.S., Antonioli, A.R., Alviano, D.S., Trindade, R.C. (2007) Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. J Ethnopharmacol, **111**, 409–412.
14. Leal, I.C.R., Santos, K.R.N., Itabaiana Jr.I., Antunes, O.A.C., Porzel, A., Wessjohann, L., Kuster, R.M. (2010) Ceanothane and lupane type triterpenes from *Zizyphus joazeiro* – An anti-staphylococcal evaluation. Planta med., **76**, 47–52.
15. Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. Science, **221**, 1256–64.
16. Konstantopoulou, I., Vassilopoulou, L., Maviaganitsipido, U., Scouras, Z.G. (1992) Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. Experientia, **48**, 616–619.
17. Tavares, W. (1996) *Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos - Introdução ao estudo dos antimicrobianos*. Atheneu, Rio de Janeiro.
18. Purves, D., Harvey, C., Tweats, D., Lumley, C.E. (1995) Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. Mutagenesis, **10**, 297–312.
19. Varanda, E.A. (2006) Atividade mutagênica de plantas medicinais. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., **27**, 1–7.
20. Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M. (2006) Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochimie, **88**, 1515–1531.
21. Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., Decordier, I. (2003) Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicol. Lett., **140–141**, 63–74.
22. Decordier, I., Dillen, L., Cundari, E., Kirsch-Volders, M. (2002) Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. Mutagenesis, **17**, 337–344.



23. OECD A Guidelines For The Testing Of Chemicals. Bacterial reverse mutation test. 1997.
24. OECD B Guidelines For The Testing Of Chemicals. *In vitro* mammalian chromosome aberration test. 1997.
25. Ribeiro, L.R., Marques, E.K., Salvadori, D.M.F. (2003) Teste de micronúcleo em medula óssea de roedor *in vivo* (Orgs). In: *Mutagênese Ambiental*. (eds), Ulbra, Canoas, pp. 173–198.
26. OECD C Guidelines For The Testing Of Chemicals. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 1997.
27. Chandrasekaran, C.V., Sundarajan, K., Gupta, A., Srikanth, H.S., Edwin, J., Agarwal, A. (2011) Evaluation of the genotoxic potential of standardized extract of *Glycyrrhiza glabra* (GutGard™). Regul. Toxicol. Pharmacol., **61**, 373–380.
28. Silva, C.R., Vieira, P.M., Santos, S.C., Chen-Chen, L. (2012) Assessment of *Duguetia furfuracea* genotoxic and cytotoxic activity in bacteria and mice. Acad. Bras. Ciênc., **84**, 149–156.
29. Indart, A., Viana, M., Clapés, S., Izquierdo, L., Bonet, B. (2002) Teratogenic actions of thermally-stressed culinary oils in rats. Free Radic. Res., **36**, 1051–1058.
30. Venkatesh, P., Shantala, B., Jagetia, G.C., Rao, K.K., Baliga, M.S. (2007) Modulation of Doxorubicin-Induced Genotoxicity by *Aegle marmelos* in Mouse Bone Marrow: A Micronucleus Study. Integr Cancer Ther., **6**, 42–53.
31. Alves, J.M., Munari, C.C., Neto, M.A.B.M., Furtado, R.A., Senedese, J.M., Bastos, J.K., Tavares, D.C. (2012) *In vivo* protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. J Appl Toxicol.
32. Fenech, M. and Morley, A.A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat. Res., **147**, 29–36.
33. Fenech, M., Baghurst, P., Luderer, W., Turner, J., Record, W., Ceppi, M., Bonassi, S. (2005) Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. Carcinogenesis, **26**, 991–999.
34. Thomas, P., Umegaki, K., Fenech, M. (2003) Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. Mutagenesis, **18**, 187–194.

35. Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A. (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutat. Res., **463**, 111–172.
36. Fenech, M. and Crott, J.W. (2002) Micronuclei, nucleopasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis–block micronucleus assay. Mutat. Res., **504**, 131–136.
37. Leach, N.T. and Jackson-Cook, C. (2004) Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei. Mutat. Res., **554**, 89–94.
38. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2010) *Farmacopéia Brasileira*. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Brasília.
39. Chorilli, M. Brizante, A.C., Rodrigues, C.A., Salgado, H.R.N. (2007) Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. Rev Bras Farm., **88**, 7–13.
40. Collaborative Study Group For The Micronucleus Test–CSGMT. (1986) Sex differences in the micronucleus test. Mutat. Res., **172**, 151–163.
41. UNESCO. (1978) Comissão de ética no uso de animais, Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO) - Bruxelas, Bélgica.
42. Schmid, W. (1976) Chemical Mutagens. In: Hollender, A. *The micronucleus test for cytogenetic analysis*. (eds), Plenum Press, New York, 31–53.
43. Zambrano, M.A., Targa, H.J., Rabello-Gay, M.N. (1982) Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. Stain Technol., **57**, 48–49.
44. Elgorashi, E.E., Taylor, J.L., Maes, A., Van–Staden, J., De–Kimpe, N., Verschaeve, L. (2003) Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. Toxicol. Lett., **143**, 195–207.
45. Arora, S., Brits, E., Kaur, S., Kaur, K., Sohi, R.S., Kumar, S., Verschaeve, L. (2005) Evaluation or genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., **24**, 193–200.
46. Yamamoto, K.I. and Kikuchi, Y. (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and poisons. Mutat. Res., **71**, 127–131.
47. Heddle, J.A., Raj, A.S., Krepinsky, A.B. (1981) The micronucleus assay. Part II. *In vitro*. In: Stich, H.F., San, K.H.C. *Short-term Tests for Chemical Carcinogens*. (eds), Springer, New York, pp. 250–254.

48. Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W., Salamone, M.F. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, a report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res., **123**, 61–118.
49. Almassy, Z., Krepinsky, A.B., Bianco, A., Koteles, G.J. (1987) The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection: a review. Int J Rad Appl Instrum, **38**, 241–249.
50. Schmid, W. (1975) The micronucleus test. Mutat. Res., **31**, 9–12.
51. Canellos, G.P., Arseneau, J.C., DeVita, V.T., Whang-Peng, J., Johnson, R.E. (1975) Second malignancies complicating Hodgkin's disease in remission. Lancet, **1**, 947–949.
52. Casciato, D.A. and Scott, J.L. (1979) Acute leukemia following prolonged cytotoxic agent therapy. Medicine (Baltimore), **58**, 32–47.
53. Ferguson, L.R. and Pearson, A.E. (1996) The clinical use of mutagenic anticancer drugs. Mutat. Res., **355**, 1–12.
54. Hospers, G.A., Eisenhauer, E.A., De-Vries, E.G. (1999) The sulfhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio- and chemoprotective agents: a review, indications for use and prospects. Br. J. Cancer, **80**, 629–638.
55. Young, R.C., Ozols, R.F., Myers, C.E. (1981) The anthracycline antineoplastic drugs. N. Engl. J. Med., **305**, 139–153.
56. Hitchcock-Bryan, S., Gelber, R.D., Cassady, J.R., Sallan, S.E. (1986) The impact of induction anthracycline on long-term failure-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. Med. Pediatr. Oncol., **14**, 211–215.
57. Myers, C. (1998) The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. Semin. Oncol., **25**, 10–14.
58. Holm, C., Goto, T., Wang, J.C., Botstein, D. (1985) DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. Cell, **41**, 553–563.
59. Uemura, T. and Yangida, M. (1986) Mitotic spindle pulls but fails to separate chromosomes in type II DNA topoisomerase mutants: uncoordinated mitosis. EMBO J., **5**, 1003–1010.
60. Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K. (1987) DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. Cell, **50**, 917–925.

61. Yanagida, M. and Sternglanz, R. (1990) Genetics of DNA topoisomerases. In: Cozzarelli, N.R., Wang, J.C. *DNA Topology and Its Biological Effects*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 299–320.
62. Liu, L.F., Liu, C.C., Alberts, B.M. (1980) Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. Cell, **19**, 697–707.
63. Anderson, R.D. and Berger, N.A. (1994) International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. Mutat. Res., **309**, 109–142.
64. Kaufmann, S.H. (1989) Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. Cancer Res., **49**, 5870–5878.
65. Del-Bino, G., Skierski, J.S., Darzynjiewicz, Z. (1991) The concentration dependent diversity of effects of DNA topoisomerase I and II inhibitors on the cell cycle of HL-60 cells. Exp. Cell Res., **195**, 485–491.
66. Trevino, A.V., Woynarowska, B.A., Herman, T.S., Priebe, W., Woynarowski, J.M. (2004) Enhanced topoisomerase II targeting by annamycin and related 4-demethoxy anthracycline analogues. Mol. Cancer Ther., **3**, 1403–1410.
67. Natarajan, A.T., Darroudi, F., Mullenders, L.H., Meijers, M. (1986) The nature and repair of DNA lesions that lead to chromosomal aberrations induced by ionizing radiations. Mutat. Res., **160**, 231–236.
68. Weiss, R.B. (2006) Toxicity of chemotherapy: the last decade. Semin. Oncol., **33**, 86–97.
69. Zweier, J.L. (1984) Reduction of O<sub>2</sub> by iron-adriamycin. J. Biol. Chem., **259**, 6056–6058.
70. Bean, C.L., Armstrong, M.J., Galloway, S.M. (1992) Effect of sampling time on chromosome aberration yield for 7 chemicals in Chinese hamster ovary cells. Mutat. Res., **265**, 31–44.
71. Al-Harbi, M.M. (1993) Effect of captopril on the cytological and biochemical changes induced by adriamycin. Food Chem. Toxicol., **31**, 209–212.
72. Al-Shabanah, O.A. (1993) Inhibition of adriamycin-induced micronuclei by desferrioxamine in Swiss albino mice. Mutat. Res., **301**, 107–111.

73. Delvaeye, M., Verovski, V., De-Neve, W., Storme, G. (1993) DNA breakage, cytotoxicity, drug accumulation and retention in two human ovarian tumor cell lines AZ224 and AZ364 treated with adriamycin, modulated by verapamil. Anticancer Res., **13**, 1533–1538.
74. Jagetia, G.C. and Nayak, V. (1996) Micronuclei-induction and its correlation to cell survival in HeLa cells treated with different doses of adriamycin. Cancer Lett., **110**, 123–128.
75. Jagetia, G.C. and Nayak, V. (2000) Effect of doxorubicin on cell survival and micronuclei formation in HeLa cells exposed to different doses of gamma-radiation. Strahlentherapie Onkol., **176**, 422–428.
76. Jagetia, G.C. and Aruna, R. (2000) Correlation between cell survival and micronuclei-induction in HeLa cells treated with adriamycin after exposure to various doses of gamma-radiation. Toxicol. Lett., **115**, 183–193.
77. Shan, K., Lincoff, A.M., Young, J.B. (1996) Anthracycline-induced cardiotoxicity. Ann. Inter. Med., **125**, 47–58.
78. Dhawan, A., Kayani, M.A., Parry, J.M., Parry, E., Anderson, D. (2003) Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. Mutagenesis, **18**, 487–490.
79. Van-Acker, S.A., Kramer, K., Grimbergen, J.A., Van-Den-Berg, D.J., Van-Der-Vijgh, W.J., Bast, A. (1996) Monohydroxyethylrutoside as protector against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. Br J Pharmacol., **115**, 1260–1264.
80. Van-Acker, F.A., Van-Acker, S.A., Kramer, K., Haenen, G.R., Bast, A., Van-Der-Vijgh, W.J. (2000) WJF. 7-Monohydroxyethylrutoside protects against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week. Clin. Cancer Res., **6**, 1337–1341.
81. Vidhya, N. and Devraj, S.N. (1999) Antioxidant effect of eugenol in rat intestine. Ind J Exp Biol., **37**, 1192–1195.
82. Boriollo, M.F.G., Souza, L.S., Resende, M.R., Silva, T.A., Oliveira, N.M.S., Braios, M.C.C.R., Dias, C.T.S., Fiorini, J.E. (2013) Nongenotoxic effects and a reduction of the DOX-induced genotoxic effects of *Helianthus annuus* Linné (sunflower) seeds revealed by micronucleus assays in mouse bone marrow. Food Chem Toxicol., *in press*.
83. Gewirtz, D.A. (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochem. Pharmacol., **57**, 727–741.

84. Painter, R.B. (1978) Inhibition of DNA replicon initiation by 4-nitroquinoline 1-oxide, adriamycin, and ethyleneimine. Cancer Res., **38**, 4445–4449.
85. Kiyomiya, K., Matsuo, S., Kurebe, M. (2001) Differences in intracellular sites of action of adriamycin in neoplastic and normal differentiated cells. Cancer Chemother. Pharmacol., **47**, 51–56.
86. Pommier, Y., Schwartz, R.E., Zwelling, L.A., Kohn, K.W. (1985) Effects of DNA intercalating agents on topoisomerase II induced DNA strand cleavage in isolated mammalian cell nuclei. Biochemistry, **24**, 6406–6410.
87. Guano, F., Pourquier, P., Tinelli, S., Binaschi, M., Bigioni, M., Animati, F., Manzini, S., Zunino, F., Kohlhagen, G., Pommier, Y., Capranico, G. (1999) Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. Mol. Pharmacol., **56**, 77–84.
88. Bachur, N.R., Gordon, S.L., Gee, M.V., Kon, H.N.R. (1979) NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **76**, 954–957.
89. Eliot, H., Gianni, L., Myers, C. (1984) Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron complex. Biochemistry, **5**, 928–936.
90. Konorev, E.A., Kennedy, M.C., Kalyanaraman, B. (1999) Cell-permeable superoxide dismutase and glutathione peroxidase mimetics afford superior protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of reactive oxygen and nitrogen intermediates. Arch. Biochem. Biophys., **368**, 421–428.
91. Lu, H.Z., Geng, B.Q., Zhu, Y.L., Yong, D.G. (1996) Effects of beta-carotene on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. Zhongguo Yao Li Xue Bao., **17**, 317–320.
92. Gulkac, M.D., Akpınar, G., Ustun, H., Ozon, K.A. (2004) Effects of vitamin A on doxorubicin-induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats. Mutagenesis, **19**, 231–236.
93. Costa, W.F. and Nepomuceno, J.C. (2006) Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen., **47**, 18–24.
94. D'Agostini, F., Bagnasco, M., Giunciuglio, D., Albini, A., De-Flora, S. (1998) Inhibition by oral N-acetylcysteine of doxorubicin-induced clastogenicity and alopecia, and prevention of primary tumors and lung micrometastases in mice. Int. J. Oncol., **3**, 217–224.

95. Al-Gharably, N.M. (1996) Effect of probucol on the cytological and biochemical changes induced by adriamycin in Swiss albino mice. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., **94**, 289–303.
96. Bardeleben, R.V., Dunkern, T., Kaina, B., Fritz, G. (2002) The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin protects cells from the antineoplastic drugs doxorubicin and etoposide. Int. J. Mol. Med., **10**, 473–479.
97. Sadzuka, Y., Sugiyama, T., Shimoi, K., Kinae, N., Hirota, S. (1997) Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. Toxicol Lett., **92**, 1–7.
98. Mackenzie, D. (2001) Complementary medicine, a special report. Swallow it whole. New Sci., **2292**, 38–40.

**Table 1.** The incidence of MNPCEs and PCE/NCE ratio in bone marrow of male and female *Swiss albinus* mice after testing for 24 h and 48 h. Shown are data from the positive and negative controls (NaCl, NEU and DOX), an evaluation of the mutagenicity of GEZJ, and an evaluation of the anti-mutagenicity of GEZJ (GEZJ + NEU and GEZJ + DOX). *One-way* statistical analysis of variance (ANOVA), in a factorial scheme  $9 \times 2 \times 2$  (treatment  $\times$  gender  $\times$  time) evaluated Tukey's test (at a significance level of 5%) using SAS<sup>®</sup> software (version 9.2).

Treatment	Number of PCEs analyzed		PCEMNs *		PCE/NCE		NCE (n)			
	24h	48h	24h (n) <sup>A</sup>	48h (n) <sup>A</sup>	24h (%) <sup>A'</sup>	48h (%) <sup>A'</sup>	24h <sup>A''</sup>	48h <sup>A''</sup>	24h	48h
<i>150 mM NaCl</i>										
Σ ♀	6276	6281	27	28	0,43	0,45	261,50	330,58	24	19
Σ ♂	6208	6260	28	35	0,45	0,56	67,48	156,50	92	40
Σ	12484	12541	55 <sup>D</sup>	63 <sup>1D</sup>	0,44 <sup>D'</sup>	0,50 <sup>D'</sup>	107,62 <sup>A''</sup>	212,56 <sup>A''</sup>	116	59
<i>N-Nitroso-N-ethylurea – NUE (50 mg.Kg<sup>-1</sup>)</i>										
Σ ♀	6034	6055	85	101	1,41	1,67	1,17	3,47	5166	1745
Σ ♂	6057	5984	194	109	3,20	1,82	1,04	0,96	5843	6216
Σ	12091	12039	279 <sup>B</sup>	210 <sup>B</sup>	2,31 <sup>B'</sup>	1,74 <sup>B'</sup>	1,10 <sup>C''</sup>	1,51 <sup>C''</sup>	11009	7961
<i>Cloridrato de Doxorubicina – DOX (5 mg.Kg<sup>-1</sup>)</i>										
Σ ♀	6253	6186	179	149	2,86	2,41	5,01	28,91	1247	214
Σ ♂	6212	6203	155	181	2,50	2,92	70,59	31,49	88	197
Σ	12465	12389	334 <sup>A</sup>	330 <sup>A</sup>	2,68 <sup>A'</sup>	2,66 <sup>A'</sup>	9,34 <sup>BC''</sup>	30,14 <sup>BC''</sup>	1335	411
<i>Glicolic extract of Z. joazeiro Mart. barks</i>										
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6216	6125	23	18	0,37	0,29	7,04	22,27	883	275
Σ ♂ <sup>B</sup>	6116	6177	23	31	0,38	0,50	33,24	50,22	184	123
Σ <sup>500 mg.kg<sup>-1</sup></sup>	12332	12302	46 <sup>D</sup>	49 <sup>D</sup>	0,37 <sup>D'</sup>	0,40 <sup>D'</sup>	11,56 <sup>BC''</sup>	30,91 <sup>BC''</sup>	1067	398
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6129	6167	30	27	0,49	0,44	5,79	11,46	1058	538
Σ ♂ <sup>B</sup>	6230	6121	38	41	0,61	0,67	6,81	17,34	915	353
Σ <sup>1,000 mg.kg<sup>-1</sup></sup>	12359	12288	68 <sup>D</sup>	68 <sup>D</sup>	0,55 <sup>D'</sup>	0,55 <sup>D'</sup>	6,26 <sup>BC''</sup>	13,79 <sup>BC''</sup>	1973	891
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6311	6223	55	45	0,87	0,72	4,90	5,54	1289	1124
Σ ♂ <sup>B</sup>	6278	6145	42	51	0,67	0,83	5,32	5,19	1181	1185
Σ <sup>1,500 mg.kg<sup>-1</sup></sup>	12589	12368	97 <sup>1CD</sup>	96 <sup>CD</sup>	0,77 <sup>D'</sup>	0,78 <sup>CD'</sup>	5,10 <sup>BC''</sup>	5,36 <sup>BC''</sup>	2470	2309
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6225	6269	56	55	0,90	0,88	4,19	4,83	1485	1298
Σ ♂ <sup>B</sup>	6111	6103	45	57	0,74	0,93	3,39	5,04	1805	1211
Σ <sup>2,000 mg.kg<sup>-1</sup></sup>	12336	12372	101 <sup>CD</sup>	112 <sup>CD</sup>	0,82 <sup>D'</sup>	0,91 <sup>CD'</sup>	3,75 <sup>BC''</sup>	4,93 <sup>BC''</sup>	3290	2509
<i>Glicolic extract of Z. joazeiro Mart. barks (2,000 mg.kg<sup>-1</sup>) + NUE (50 mg.Kg<sup>-1</sup>)</i>										
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6195	6301	80	56	1,29	0,89	30,22	63,65	205	99
Σ ♂ <sup>B</sup>	6354	6420	93	98	1,46	1,53	25,83	5,94	246	1080
Σ	12549	12721	173 <sup>C</sup>	154 <sup>C</sup>	1,38 <sup>C'</sup>	1,21 <sup>C'</sup>	27,82 <sup>BC''</sup>	10,79 <sup>BC''</sup>	451	1179
<i>Glicolic extract of Z. joazeiro Mart. barks (2,000 mg.kg<sup>-1</sup>) + DOX (5 mg.Kg<sup>-1</sup>)</i>										
Σ ♀ <sup>A*</sup>	6246	6265	67	55	1,07	0,88	115,67	179,00	54	35
Σ ♂ <sup>B</sup>	6234	6260	56	44	0,90	0,70	94,45	156,50	66	40
Σ	12480	12525	123 <sup>CD</sup>	99 <sup>CD</sup>	0,99 <sup>CD'</sup>	0,79 <sup>CD'</sup>	104,00 <sup>A''</sup>	167,00 <sup>A''</sup>	120	75

The letters A, B, C and D correspond to Tukey's studentized range (the same letter are not significantly different.  $p < 0.05$ ).



## 9. SUBMISSÃO DE ARTIGO

Artigo científico submetido eletronicamente ao *Mutagenesis*: <http://mutage.oxfordjournals.org/>.

OXFORD JOURNALS CONTACT US MY BASKET MY ACCOUNT


# mutagenesis

ABOUT THIS JOURNAL CONTACT THIS JOURNAL SUBSCRIPTIONS CURRENT ISSUE ARCHIVE SEARCH

**Nominations for the eighth biennial Carcinogenesis awards now open. Click for more information.**

Oxford Journals > Life Sciences & Medicine > Mutagenesis

### READ THIS JOURNAL



View Current Issue (Volume 28 Issue 3 May 2013)  
Advance Access

Browse the Archive

Mutagenesis is an international multi-disciplinary journal designed to bring together research aimed at the identification, characterization and elucidation of the mechanisms of action of physical, chemical and biological agents capable of producing genetic change in living organisms and the study of the consequences of such changes.

**Click here for a FREE collection of Mutagenesis' most popular articles in 2012.**

Read the special issue: COLORECTAL CANCER - Current insights into susceptibility, edited by Pavel Vodicka.

### LATEST ARTICLES

Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay  
Cheong, H. S. J., Seth, I., Joiner, M. C., Tucker, J. D.

Mitotic slippage underlies the relationship between p53 dysfunction and the induction of large micronuclei by colcemid  
Hashimoto, K., Todo, T.

Kinetics of nuclear phosphorylation ((gamma)-H2AX) in human lymphocytes treated in vitro with UVB, bleomycin and mitomycin C  
Scarpato, R., Castagna, S., Aliotta, R., Azzara, A., Ghetti, F., Filomeni, E., Giovannini, C., Pirillo, C., Teati, S., Lombardi, S., Tomasi, A.

A genetic variant in ERCC2 is associated with gastric cancer prognosis in a Chinese population  
Chu, H., Gu, D., Xu, M., Xu, Z., Gong, Y., Gong, W., Tang, Y., Zhou, J., Tong, N., Zhang, Z., Chen, J., Wang, M.

### THE JOURNAL

- > About this journal
- > Publishers' Books for Review
- > Rights & Permissions
- > Dispatch date of the next issue
- > This journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE)
- > We are mobile - find out more

Published on behalf of

- > The UK Environmental Mutagen Society


Impact factor: 3.183

Editor-in-Chief  
Professor David Phillips

- > View full editorial board


### FOR AUTHORS

- > Instructions to authors
- > Online submission
- > Submit Now!

OXFORD  OPEN

Open access options for authors - visit Oxford Open

- > Self-archiving policy



> This journal enables compliance with the NIH Public Access Policy

### ALERTING SERVICES


- > Email table of contents
- > Email Advance Access
- > CiteTrack
- > XML RSS feed

### CORPORATE SERVICES


- > Advertising sales
- > Reprints
- > Supplements



### WIDGET


- > Get a widget


SEARCH THIS JOURNAL   > Advanced search


### RELATED PUBLICATIONS










### READER SERVICES

- > Careers online
- > Free sample issue
- > 50 Most Frequently Cited Articles
- > Library Recommendation Form
- > Read the latest Oxford Journals research to hit the headlines
- > Special Issue: The Comet Assay, Guest edited by V. McKelvey-Martin

Online ISSN 1464-3804 - Print ISSN 0267-8357 Copyright © 2013 United Kingdom Environmental Mutagen Society

OXFORD UNIVERSITY PRESS Site Map Privacy Policy Cookie Policy Legal Notices Frequently Asked Questions

Other Oxford University Press sites:  
 

Aug 05, 2013

To Mutagenesis Editorial Office

Dear Editor-in-Chief,

**Professor David Phillips**

*Mutagenesis*

King's College London

Third Floor

Franklin-Wilkins Building

150 Stamford Street

London SE1 9NH

UK

We would like to submit our manuscript entitled “**Reduction of the dox-induced genotoxic effects and nonmutagenic effects of *Ziziphus joazeiro* Mart. revealed by micronucleus assays**” for your consideration. We assure you that the content is original and not presently under consideration for publication elsewhere. The manuscript has been reviewed and agreed upon by all authors and is solely the work of the following researchers: **Boriollo MFG, Resende MR, Silva TA, Públio JY, Souza LS, Dias CTS, Oliveira NMS, Fiorini FE**. We can assure you that the text has been carefully revised and formatted according to Author Guidelines.

We thank you in advance for your consideration and hope that the manuscript is now suitable for publication in **Mutagenesis**.

Our most sincere regards,

Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, BSB, MSc, PhD.