



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JOSIANE MENDES

**MODULAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO POR  
FITOESTRÓGENOS**  
*in vitro e in vivo*

---

Londrina  
2008

**JOSIANE MENDES**

**MODULAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO POR  
FITOESTRÓGENOS**

*in vitro e in vivo*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial á obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina  
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M538m Mendes, Josiane.  
Modulação do efeito mutagênico por fitoestrógenos *in vitro* e *in vivo* /  
Josiane Mendes. – Londrina, 2008.  
74f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Patologia Experimental, 2008.

Bibliografia: f.64-71.

1. Fitoestrógenos – Teses. 2. Testes de mutagenicidade – Teses.  
3. Genética vegetal – Teses. 4. Patologia experimental – Teses. I.  
Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro  
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Experimental. III. Título.

CDU 616-092

**JOSIANE MENDES**

**MODULAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO POR  
FITOESTRÓGENOS**  
*in vitro e in vivo*

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Verônica Elisa Pimenta Vicentini  
Universidade Estadual de Maringá

---

Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 27 de fevereiro de 2008.

Dedico aos meus pais pelo imenso  
amor, carinho e dedicação que  
dispensaram a mim.

Dedico ao meu namorado Leonardo,  
pelo incentivo, paciência e companhia  
em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Mário Sérgio Mantovani, pela orientação, confiança e incentivo;

À banca examinadora, composta pela Dra. Verônica Elisa Pimenta Vicentini e Dra. Tânia Longo Mazzuco, por suas sugestões e correções;

À coordenação do Programa de Mestrado em Patologia Experimental;

À Universidade Estadual de Londrina;

Aos colegas da mutagênese, especialmente Marcela, Juliana, Rodrigo, Ariane e Andressa, pela troca de informações, ajuda e amizade.

Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.

(Dalai Lama)

MENDES, Josiane. **Modulação do efeito mutagênico por fitoestrógenos *in vitro* e *in vivo***. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

Alimentos e suplementos alimentares contendo fitoestrógenos estão sendo cada vez mais utilizados, pois estudos epidemiológicos apontam que a ingestão de alimentos ricos nesses fitoquímicos confere proteção contra várias formas de câncer. As isoflavonas, que são os fitoestrógenos mais conhecidos, são encontradas abundantemente no grão de soja (*Glycine max*). No presente estudo, o fitoestrógeno da soja foi testado quanto ao potencial genotóxico, mutagênico e protetor frente a agentes mutagênicos já conhecidos, benzo[a]pireno, bleomicina e ciclofosfamida, sendo o primeiro um contaminante alimentar e os dois últimos agentes quimioterápicos. Dois fitoestrógenos da soja foram avaliados *in vitro*, um deles foi fornecido pela EMBRAPA-Soja, Londrina – PR (A), e o outro comprado em uma farmácia de manipulação local (B). Nos experimentos *in vivo* foi utilizado apenas o composto fornecido pela EMBRAPA-Soja (A). Os métodos utilizados foram o “Ensaio do Cometa” e o “Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese” em células HTC (hepatoma de *Rattus norvegicus*) para os experimentos *in vitro* e em células do sangue periférico de camundongos Swiss (*Mus musculus*) para os experimentos *in vivo*. Na avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade *in vitro*, os fitoestrógenos foram testados em 3 concentrações pré-estabelecidas pelo Ensaio de Citotoxicidade (MTT): 2,5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL em cultura celular, demonstrando não ser genotóxicos, porém mutagênicos. No experimento *in vivo* as concentrações do fitoestrógeno A testadas foram: 0,083mg/Kg, 0,83mg/Kg e 8,3mg/Kg de peso corpóreo, a qual foi genotóxica, porém não mutagênica. Na avaliação da antigenotoxicidade e antimutagenicidade em cultura, os fitoestrógenos, nas concentrações descritas acima, foram associados a agentes indutores de danos bleomicina ou benzo[a]pireno e apresentaram antigenotoxicidade mas não antimutagenicidade. Nos ensaios em animais o fitoestrógeno A foi associado com a ciclofosfamida e apresentou atividade antigenotóxica e antimutagênica. Os dados sugerem que os fitoestrógenos podem interferir na mutagenicidade de substâncias químicas e os dados *in vitro* de mutagenicidade implicam em cautela no uso indiscriminado dessas substâncias por seres humanos, contudo os dados *in vivo* foram negativos para mutagenicidade.

**Palavras-chave:** Fitoestrógeno. Mutagenicidade. Genotoxicidade. Antimutagenicidade. Antigenotoxicidade.

MENDES, Josiane. **Modulation of the mutagenic effect for phytoestrogens *in vitro* e *in vivo***. 2008. 68f. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina, 2008.

### ABSTRACT

Foods and food supplements containing phytoestrogens have been much more used, because epidemiologic studies indicate that the intake of foods rich in these phytochemicals confer protection against various types of cancer. Isoflavones, which are the best-known phytoestrogens, are found in abundance in soybeans (*Glycine max*). In the present study, soy phytoestrogen was tested with regard to its genotoxic and mutagenic potential and protective effects against the known mutagens benzo[a]pyrene, bleomycin and cyclophosphamide, the first being a food contaminant and the other two chemotherapeutic agents. Two soy phytoestrogens were evaluated *in vitro*, where one of them was supplied by EMBRAPA-Soja, Londrina – PR (A), and the other bought at a local compounding pharmacy (B). In the *in vivo* experiments, only the preparation supplied by EMBRAPA-Soja (A) was used. The analytical methods utilized were the comet assay and the micronucleus test with cytokinesis block in HTC cells (*Rattus norvegicus* hepatoma) for the *in vitro* experiments and in peripheral blood cells of Swiss mice (*Mus musculus*) for the *in vivo* experiments. In the determination of genotoxicity and mutagenicity *in vitro*, the phytoestrogens were tested at 3 concentrations that were previously established by the MTT cytotoxicity assay: 2.5 µg/mL, 25 µg/mL and 250 µg/mL in cell culture medium, which demonstrated that they were mutagenic but not genotoxic. In the *in vivo* experiment, the concentrations of phytoestrogen A tested were: 0.083 mg/Kg, 0.83 mg/Kg and 8.3 mg/Kg body weight, which showed that the product was genotoxic but not mutagenic. In the determination of antigenotoxicity and antimutagenicity in cell culture, the phytoestrogens, at the concentrations noted above, were combined with the DNA damage inducing agent bleomycin or benzo[a]pyrene and showed antigenotoxicity but not antimutagenicity. In the animal experiments, phytoestrogen A was combined with cyclophosphamide and showed antigenotoxic and antimutagenic activities. The data suggest that the phytoestrogens can interfere with the mutagenicity of chemical substances, and the *in vitro* findings of mutagenicity urge caution in the indiscriminate use of these substances by humans, albeit the *in vivo* data were negative for mutagenicity.

**Keywords:** Phytoestrogen. Mutagenicity. Genotoxicity. Antimutagenicity. Antigenotoxicity .

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

<b>Figura 01</b> – Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonóides.....	23
<b>Figura 02</b> – Microscopia óptica de células após coloração com o azul de trypan (células mortas coraram em azul) .....	31
<b>Figura 03</b> – Critério de classificação para a análise do Ensaio do Cometa. Classe 0 (sem dano), classe 1 (dano pequeno), classe 2 (dano médio) e classe 3 (dano grande).....	33
<b>Figura 04</b> – Células binucleadas sem micronúcleo (A) e com micronúcleo (B).....	35

### Resultados

<b>Figura 01</b> – Escore de cometas observado em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B .....	39
<b>Figura 02</b> – Escore de cometas observado em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com a bleomicina ou com o benzo[a]pireno .....	41
<b>Figura 03</b> – Frequências de células binucleadas com MN observadas em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B .....	43
<b>Figura 04</b> – Frequências de células binucleadas com MN observadas em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com a bleomicina ou com o benzo[a]pireno .....	45
<b>Figura 05</b> – Escore de cometas observado em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com fitoestrógeno da soja A e em associação com a ciclofosfamida.....	47
<b>Figura 06</b> – Número médio de células com micronúcleo observado em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com o fitoestrógenos da soja A e em associação com a ciclofosfamida.....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> – Avaliação da genotoxicidade, no Ensaio do Cometa, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B .....	39
<b>Tabela 02</b> – Avaliação da antigenotoxicidade, no Ensaio do Cometa, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com a bleomicina .....	40
<b>Tabela 03</b> – Avaliação da antigenotoxicidade, no Ensaio do Cometa, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com o benzo[a]pireno .....	41
<b>Tabela 04</b> – Avaliação da mutagenicidade, no Ensaio do Micronúcleo, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B .....	42
<b>Tabela 05</b> – Avaliação da antimutagenicidade, no Ensaio do Micronúcleo, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com a bleomicina .....	44
<b>Tabela 06</b> – Avaliação da antimutagenicidade, no Ensaio do Micronúcleo, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com o benzo[a]pireno .....	44
<b>Tabela 07</b> – Avaliação da genotoxicidade, no Ensaio do Cometa, em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com o fitoestrógenos da soja A.....	46
<b>Tabela 08</b> – Avaliação da antigenotoxicidade, no Ensaio do Cometa, em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com o fitoestrógenos da soja A associado com a ciclofosfamida.....	46
<b>Tabela 09</b> – Avaliação da mutagenicidade, no Ensaio do Micronúcleo, em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com o fitoestrógeno da soja A.....	48
<b>Tabela 10</b> – Avaliação da antimutagenicidade, no Ensaio do Micronúcleo, em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com o fitoestrógeno da soja A associado com a ciclofosfamida.....	49
<b>Tabela 11</b> – Representação geral dos resultados obtidos nos Ensaio do Cometa e Micronúcleo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	50

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 ASPECTOS DA MUTAGÊNESE .....	13
1.2 ASPECTOS DA ANTIMUTAGÊNESE.....	16
1.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE MTT .....	19
1.4 ENSAIO DO COMETA .....	19
1.5 ENSAIO DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE.....	21
1.6 FITOESTRÓGENOS DA SOJA ( <i>Glycine max</i> ) .....	22
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	27
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 FITOESTRÓGENOS DA SOJA ( <i>Glycine max</i> ) .....	28
4.2 INDUTORES DE DANO .....	28
4.3 LINHAGEM CELULAR E OS ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO .....	29
4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS NO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – MTT.....	29
4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS PARA O TESTE DE VIABILIDADE CELULAR .....	31
4.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS NO ENSAIO DO COMETA <i>in vitro</i> .....	32
4.6.1 Coleta de células.....	32
4.6.2 Coloração e análise das lâminas .....	33
4.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS NO ENSAIO DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE ( <i>in vitro</i> ).....	34
4.7.1 Coleta das células .....	34
4.7.2 Coloração e análise das lâminas .....	35
4.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS PARA O ENSAIO DO COMETA E ENSAIO DO MICRONÚCLEO <i>in vivo</i> .....	35
4.8.1 Procedimentos para o Ensaio do Cometa .....	36

4.8.2 Procedimentos para o Ensaio do Micronúcleo .....	37
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>5 RESULTADO</b> .....	<b>38</b>
5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE MTT .....	38
5.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR .....	38
5.3 ENSAIO DO COMETA <i>in vitro</i> .....	38
5.4 TESTE DO MICRONÚCLEO <i>in vitro</i> .....	42
5.5 ENSAIO DO COMETA <i>in vivo</i> .....	45
5.6 TESTE DO MICRONÚCLEO <i>in vivo</i> .....	47
5.7 RESUMO DOS RESULTADOS .....	50
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>64</b>
ANEXO 1 .....	65
ANEXO 2 .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da sociedade nos setores da indústria, agricultura e urbanização levaram ao aumento do número de substâncias estranhas ao organismo humano, os xenobióticos, as quais o homem está exposto na alimentação, por medicamentos ou exposição ambiental. Os agentes químicos, físicos e biológicos podem interagir de diversas formas com o homem, sendo benéficos, prejudiciais ou indiferentes frente ao contato. Por isso é imprescindível identificar os agentes potencialmente mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos e estabelecer normas para o seu uso (REIFFERSCHIED & HEIL, 1996). A genética toxicológica é uma das áreas da toxicologia que avalia os efeitos de agentes químicos e físicos sobre o DNA e sobre os processos genéticos das células. Desta forma, esta ciência tem um importante papel na identificação de agentes tóxicos e protetores do DNA na célula (TWEATS et al., 2007).

O monitoramento dos efeitos genotóxicos dos xenobióticos está sendo cada vez mais aplicado com o propósito de identificar e avaliar os riscos ao ser humano (ALBERTINI et al., 2000). A maioria dos testes em toxicidade genética busca agentes que possam afetar o genoma, portanto, podem ser utilizados para avaliação de riscos ao DNA, e sendo este a molécula alvo, todos os organismos que o contêm podem ser utilizados para testes de genotoxicidade (BRUSICK, 1987).

Os órgãos reguladores de todo o mundo utilizam os testes de genotoxicidade como parâmetro para liberação de novos fármacos, agrotóxicos, aditivos químicos, cosméticos e alimentos industrializados para a comercialização (VANHAUWAERT et al., 2001; LORGE et al., 2007).

Diversas agências regulatórias determinam que a triagem das substâncias testes deva ser realizada por pelo menos dois ou três testes, que incluem: um teste para indução de mutação gênica em bactérias (teste de Ames), um teste de mutação gênica em células de mamífero *in vitro* (*mouse lymphoma assay*), um teste *in vitro* de dano cromossômico em células de mamíferos (teste do micronúcleo). Dependendo da resposta dos testes e dos tipos de substâncias testadas, um ou mais testes *in vivo* em animais é realizado (teste do micronúcleo em medula óssea ou sangue ou análise de metáfase em células de medula óssea) (SNYDER & GREEN, 2001; KIRKLAND, et al., 2007; LORGE et al., 2007; THYBAUD et al., 2007). Muitas destas agências padronizam ensaios e desta maneira facilitam a comparação dos resultados das pesquisas realizadas em todo mundo. Hoje, existe uma grande variedade de

metodologias para o monitoramento da mutagênese e a escolha depende basicamente das condições do laboratório e/ou dos objetivos do trabalho (VILLELA et al., 2003).

Uma substância é considerada genotóxica quando apresenta resultado positivo em pelo menos um dos testes da bateria de genotoxicidade (SNYDER & GREEN, 2001).

Dentre os testes, os ensaios microbianos *in vitro* têm se mostrado muito adequados na triagem de substâncias químicas e amostras ambientais (ex: água, solo, alimentos, etc) (RABELLO-GAY, 1991). Segundo Kuroda et al. (1992) diferentes organismos acabam por ter em certos casos diferentes respostas frente aos agentes genotóxicos por possuírem metabolismo, mecanismos de reparo e detoxificação variados entre eles, e isso torna difícil a correlação dos dados com os animais superiores e a avaliação de risco dos agentes ao DNA. Assim, são mais relevantes os ensaios *in vitro* e *in vivo* usando plantas, insetos e mamíferos para suprir a necessidade de informações em mutagênese e carcinogênese humana. Contudo, quando comparamos sistemas-teste em microrganismos, vegetais e animais, os sistemas de mamíferos são os mais aceitáveis para se tentar fazer uma extrapolação dos resultados obtidos para os potenciais efeitos sobre o homem.

## 1.1 ASPECTOS DA MUTAGÊNESE

A mutagênese é a ciência que estuda o processo de indução de danos no DNA pela ação de agentes químicos, físicos e biológicos. Muitos testes têm sido desenvolvidos para aumentar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares de ação destes agentes (REIFFERSCHIED & HEIL, 1996).

Os agentes mutagênicos causadores de danos no DNA podem atuar de maneira direta, sem a necessidade de sistema de metabolização, pois por si só causam dano (ex: bleomicina, metilmetanosulfonato, etc) ou de maneira indireta, necessitam ser metabolizados para que seus metabólitos danifiquem o DNA (ex: ciclofosfamida, benzo[a]pireno) (BRUSICK, 1987).

Linhagens celulares hepáticas, tais como HTC (hepatoma de *Rattus norvegicus*), HepG2 (linhagem celular humana) e culturas primárias de hepatócitos são de grande utilidade em estudos de genotoxicidade e mutagenicidade, uma vez que o fígado é o principal sítio de metabolização de xenobióticos (ANDERSON et al., 1998; MERSH-

SUNDERMANN et al., 2004). Assim sendo, tais células apresentam diferentes enzimas de fase I e fase II envolvidas na ativação/detoxificação de drogas e outros compostos (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; MAJER et al., 2004).

As enzimas de fase I, que representam as enzimas do citocromo P450, catalisam a ativação metabólica de promutágenos e procarcinógenos, e assim modificam ou criam grupos funcionais na molécula que se ligam covalentemente ao DNA produzindo mutagenicidade ou carcinogenicidade. No entanto, as enzimas de fase I também estão envolvidas no processo de detoxificação de xenobióticos, assim como as enzimas de fase II (ex UDP-glucuronil transferase, glutathione S-transferase) que metabolizam muitos carcinógenos a metabólitos inativos (CONNEY, 2003; FERGUSON et al., 2004; MOON et al., 2006).

Vários componentes da dieta alimentar representam riscos para a saúde e são mutágenos já reconhecidos podendo atuar como tal em sistemas *in vivo* e *in vitro*, como os compostos formados pelo cozimento da carne e do peixe (aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), compostos N-nitroso formados pelo processamento de alimentos com altos níveis de nitrato, toxinas fúngicas, etc (FERGUSON et al., 2004).

Uma substância genotóxica tem como propriedade causar lesões genômicas que são passíveis de correção pelo sistema de reparo de erros do DNA, no entanto, se não reparadas estas lesões podem resultar em mutação (GONTIJO & TICE, 2003). Os agentes mutagênicos causam danos no DNA que não são passíveis de reparo, portanto originam uma mutação que é transmitida célula a célula durante a proliferação celular.

Erros durante a replicação do DNA desencadeiam alterações denominadas de mutações e apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos podem determinar um crescimento desordenado das células (RIBEIRO & MARQUES, 2003). A mutação é definida como sendo qualquer alteração do DNA que não resulte de processos normais como a segregação ou recombinação genética, onde os organismos mais complexos (eucariontes) estão sob um rigoroso controle para reduzir os erros (RABELLO-GAY, 1991).

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Pois, sem mutação, não há variabilidade genética e assim não há evolução (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

Mutações não ocorrem somente de forma espontânea, podem também ser induzidas a partir de agentes físicos, químicos e biológicos (REIFFERSCHIED & HEIL, 1996; DE FLORA & FERGUSON, 2005).

Quando a mutação ocorre em células somáticas pode se propagar durante a proliferação celular e estar envolvida com doenças degenerativas crônicas, tais como aterosclerose, doenças do coração e câncer (DE FLORA, 1998; DE FLORA & FERGUSON, 2005).

O câncer parece estar associado intimamente com a mutagênese. A mutação pode ser responsável pela ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores tumorais favorecendo a formação do tumor (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

Os proto-oncogenes são genes que estão envolvidos em funções celulares normais, mas que são equivalentes a oncogenes carregados por alguns retrovírus. Em certos casos, mutações ou a ativação anormal dos mesmos está associada à formação de tumores. A ativação de um oncogene representa um evento de ganho de função, no qual um proto-oncogene celular é ativado inapropriadamente (LEWIN, 2001).

Os genes supressores tumorais são detectados por deleções ou outras mutações inativadoras que são tumorigênicas. Uma mutação em um supressor pode representar uma perda de função em genes que normalmente impõem alguns limites ao ciclo celular ou ao crescimento celular (LEWIN, 2001).

Deficiências nos genes de reparo de erros do DNA, como por exemplo, as proteínas MMR (*Mismatch repair*), as quais zelam pela estabilidade do DNA durante a replicação, também estão associadas à carcinogênese, pois levam ao acúmulo de mutações no genoma, dentre elas aquelas que modificam os genes que regulam o ciclo celular (p53, p21, p27, p16, Rb, etc). Assim, a desregulação de mecanismos que controlam o ciclo celular poderá resultar na iniciação do câncer (PINTO & FELZENSZWALB, 2003).

A carcinogênese está diretamente relacionada com o prolongado acúmulo de agressões em diferentes níveis biológicos, que alteram as células tanto do ponto de vista genético quanto bioquímico. Uma nova estratégia para reduzir a sua incidência relaciona-se a programas de intervenção voltados para a dieta e nutrição, bem como para o desenvolvimento de produtos farmacológicos que poderiam funcionar como quimiopreventivos (ERDTMANN, 2003).

## 1.2 ASPECTOS DA ANTIMUTAGÊNESE

As doenças degenerativas crônicas representam hoje as maiores causas de morte na população, e o controle destas doenças torna-se difícil por ser de origem multifatorial. No entanto, esforços têm sido realizados no intuito de diminuir a taxa de mortalidade por estas doenças (DE FLORA & FERGUSON, 2005).

Embora não se possa generalizar, várias doenças crônicas podem compartilhar determinantes patogênicos comuns, tais como danos ao DNA, estresse oxidativo e inflamação crônica. Assim como podem compartilhar também os fatores de riscos, sendo físicos, químicos ou biológicos. Seguindo o mesmo raciocínio, as estratégias de prevenção do câncer são ao mesmo tempo benéficas para prevenir outras doenças crônicas e vice versa (DE FLORA & FERGUSON, 2005).

A prevenção do câncer e de outras doenças relacionadas ao processo de mutagênese (aterosclerose, doenças cerebrovasculares e doenças degenerativas do coração) pode ser feita de três maneiras: evitando a exposição aos agentes mutagênicos ou carcinogênicos, favorecendo a ingestão de fatores protetores e fortalecendo os mecanismos de defesa do organismo (DE FLORA, 1998).

Os mecanismos de ação dos fatores inibidores da mutagênese e carcinogênese foram classificados por De Flora e Ramel em 1988, os quais foram revisados posteriormente (DE FLORA, 1998; DE FLORA et al., 2001; DE FLORA & FERGUSON, 2005). A classificação analisa primeiramente a inibição da mutação e iniciação do câncer por mecanismos extracelulares e intracelulares, e posteriormente a interferência destes mecanismos nos outros estágios da carcinogênese, ex: promoção, progressão, invasão e metástase. A cascata dos mecanismos funciona de forma flexível e envolve: inibição dos efeitos genotóxicos, atividade antioxidante e seqüestro de radicais livres, inibição da proliferação celular, indução da diferenciação celular, modulação da transdução de sinal, entre outros.

Três níveis de prevenção foram propostos em relação aos mecanismos dos agentes quimioprotetores. A prevenção primária tem como objetivo prevenir a ocorrência de doença no indivíduo saudável, inibindo a mutação e a iniciação do câncer. A prevenção secundária ocorre em pacientes com detecção precoce da doença e sem manifestações clínicas, está relacionada com a inibição da promoção tumoral através de atividade antioxidante e seqüestro de radicais livres, inibição de proteases, entre outros. O terceiro nível

de prevenção tem por meta inibir a invasão e metástase em indivíduos submetidos à terapia (DE FLORA et al., 2001; DE FLORA & FERGUSON, 2005).

Qualquer substância capaz de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação, é considerada antimutagênica (DE FLORA, 1998).

Os agentes antimutagênicos foram classificados em dois grupos, desmutagênicos e bioantimutagênicos. O primeiro, caracteriza-se pela atuação do composto diretamente no agente mutagênico, ou em seus precursores, inativando-os química ou enzimaticamente antes desses atuarem sobre o DNA; e o grupo dos bioantimutagênicos, age modulando o reparo e a replicação do DNA (KADA et al., 1982; KADA & SHIMOI, 1987).

Muitos compostos antimutagênicos e anticarcinogênicos têm sido estudados *in vitro* e *in vivo* a partir de constituintes encontrados na natureza e, por conseguinte nos alimentos. Deste modo a dieta pode ser o fator chave na determinação da instabilidade genômica e na prevenção de certas doenças (RIBEIRO & SALVADORI, 2003). No entanto, foi relatado que muitos compostos químicos antimutagênicos e anticarcinogênicos também possuem atividades mutagênicas e carcinogênicas, algumas das quais aparecem apenas em condições restritas (ZEIGER, 2003).

Alguns componentes da dieta com atividade quimioprotetora, tais como vitaminas A, C, E, beta-caroteno (vitaminas antioxidantes), também apresentam efeitos adversos como mutagenicidade, carcinogenicidade ou outros efeitos tóxicos em algumas circunstâncias (KASSIE et al., 2003; LEE & PARK, 2003). Suplementos de beta-caroteno podem aumentar o risco de câncer de pulmão em fumantes de cigarro; um dos possíveis mecanismos para esse efeito nocivo é o aumento na proliferação celular e o alto nível de radicais livres presente no pulmão de fumantes, os quais podem aumentar a oxidação do beta-caroteno e a formação de metabólitos oxidativos (VAINIO, 1999). A vitamina E demonstrou ser estimuladora para o crescimento de tumores intestinais transplantados em ratos e camundongos, quando estes receberam repetidas injeções de vitamina E (LEE & PARK, 2003). Estudos de antígenotoxicidade utilizando ácido ascórbico (vitamina C) ou vitamina E contra genotoxicidade de amins heterocíclicas em células HepG2, mostraram que estes micronutrientes são genotóxicos em altas concentrações (KASSIE et al., 2003).

Assim, micronutrientes, como as vitaminas que são antioxidantes, portanto antimutagênicas, quando utilizadas em altas doses na fase de desenvolvimento neoplásico no processo de carcinogênese (iniciação, promoção, desenvolvimento) são alimentos aceleradores do crescimento celular, tornando-se carcinogênicas (FERGUSON, 1994).

Os agentes quimioprotetores devem ser usados para o controle de nutrientes, componentes alimentares e outras substâncias químicas, a uma dose segura que efetivamente interfira ou interrompa o processo de carcinogênese (LEE & PARK, 2003).

As fibras alimentares protegem da mutação por aumentarem o volume fecal e diminuïrem o tempo de contato do mutágeno com o trato gastrintestinal, além de adsorverem os carcinógenos (FERGUSON et al., 2004).

O selênio é imprescindível para o funcionamento de enzimas de reparo do DNA. Pesquisas apontam que populações que vivem em solos pobres em selênio e, portanto ingerem pouco selênio na alimentação são propensas ao câncer (FERGUSON et al., 2004).

O feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) é um importante alimento consumido amplamente pela população mundial devido suas propriedades nutricionais, sua utilização em testes de antimutagenicidade e antigenotoxicidade *in vivo* mostrou redução na incidência de danos ao DNA pela ciclofosfamida (RIBEIRO & SALVADORI, 2003).

Diversos cogumelos comestíveis têm sido estudados pelas suas propriedades nutricionais e medicinais. Os extratos aquosos do cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murill) foram avaliados e apresentaram atividade protetora contra o agente químico metilmetanosulfonato (MMS) *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2002).

Oliveira et al. (2006) observaram o efeito quimiopreventivo da  $\beta$ - glucana em células da linhagem HTC tratadas com o agente alquilante 2-aminoantraceno (2AA) que é convertido a metabólito reativo através de enzimas de fase I. Provavelmente esta quimioprevenção esteja relacionada com a interferência da  $\beta$ - glucana na expressão de genes que codificam estas enzimas ou na sua atividade.

O flavonóide crisina, encontrado em alimentos originados de plantas, apresenta efeito protetor contra a amina aromática heterocíclica PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-*b*]piridina), pois induz a síntese de enzimas envolvidas na sua biotransformação que fazem a detoxificação (KASSIE et al., 2003).

Polimorfismos de genes que codificam enzimas do sistema P450 podem modular o impacto dos mutágenos da dieta em humanos e assim a suscetibilidade ao câncer. Deste modo concluiu-se que a modulação de enzimas que metabolizam xenobióticos afetam a probabilidade do mutágeno atingir a célula alvo e interagir com o DNA (FERGUSON et al., 2004).

### 1.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE MTT

É interessante para muitos testes biológicos a análise de sobrevivência e proliferação das células sob ação de uma substância como um parâmetro inicial de toxicidade. Isto pode ser determinado através de testes de citotoxicidade, sendo os mais comumente empregados: o *neutral red* teste, o teste de dosagem protéica, teste da lactato desidrogenase (LDH), teste da mensuração do ATP e o teste do 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006; ULUKAYA et al., 2008).

O Ensaio MTT, proposto por Mossmann (1983), é um dos mais empregados e um dos mais sensíveis testes para a detecção de citotoxicidade após a exposição das células a substâncias tóxicas (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). Este teste colorimétrico apresenta vantagens como rapidez e precisão, pois não é necessária nenhuma lavagem das células durante o teste, o que aumenta a velocidade na qual as amostras são processadas e diminui a variabilidade entre as amostras.

O método envolve a conversão do MTT, um sal tetrazólio de cor amarela claro, em um composto (formazan) insolúvel de coloração azul escuro pelas células viáveis. Tal reação geralmente é atribuída à atividade das mitocôndrias, uma vez que a quantidade de formazan gerado por célula depende do nível de atividade metabólica da célula (MOSSMANN, 1983). Então, quanto mais células ativas metabolicamente, mais MTT é convertido a formazan, desta forma este teste pode ser usado para mensurar citotoxicidade, proliferação ou ativação celular.

Como o produto formado é impermeável às membranas celulares, este se acumula nas células vivas e então é medido espectrofotometricamente a 560 nm.

### 1.4 ENSAIO DO COMETA

O Ensaio do Cometa, conhecido também como eletroforese em gel de células individuais (*single cell gel electrophoresis - SCG*), é um teste de alta sensibilidade (TICE et al., 2000).

A técnica do Cometa tornou-se amplamente utilizada no biomonitoramento humano por demonstrar habilidade em detectar danos no DNA em células eucarióticas tratadas *in vitro* ou *in vivo* com agentes genotóxicos e devido sua fácil aplicabilidade.

De acordo com as condições eletroforéticas, o teste pode detectar vários tipos de danos no DNA, como quebra de fita simples ou dupla, sítio álcali lábeis, *crosslinking* e excisões de reparo incompletas quando sistemas celulares entram em contato com agentes genotóxicos (ALBERTINI et al., 2000).

O Teste do Cometa evidencia a ocorrência de danos ao DNA pela separação de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrida eletroforética, produzindo figuras semelhantes a cometas, e assim determina-se a extensão do dano ao DNA (FAIRBAIRN et al., 1995).

Östling e Johanson em 1984 foram os primeiros a desenvolver a técnica da microeletroforese para detectar danos ao DNA em células individuais. As células foram embebidas em gel de agarose e colocadas em uma lâmina, posteriormente foram lisadas por detergentes e sais, e o DNA liberado passou por eletroforese em condições neutras. Células com aumento de danos apresentam aumento na migração de fragmentos do DNA em direção ao ânodo. A migração do DNA foi quantificada através da coloração por brometo de etídeo e pela mensuração da intensidade de fluorescência em dois pontos fixados dentro do padrão de migração em microscópio com fotômetro. As condições neutras de eletroforese utilizadas limitam a utilidade do teste, pois este detecta somente a presença de quebras de cadeia dupla de DNA (TICE et al., 2000).

A eletroforese em pH alcalino ( $\text{pH} > 13$ ) foi introduzida por Singh e colaboradores em 1988, e transformou o Ensaio do Cometa em uma técnica de grande importância na detecção de quebras de filamentos simples e duplos e de danos em sítios álcali-lábeis no DNA de células individuais, *in vivo* e *in vitro*. Porque os agentes genotóxicos induzem em maior escala mais quebra de fita simples e lesões em sítios álcali - lábeis do que quebras de dupla fita (TICE et al., 2000).

A técnica do cometa apresenta várias vantagens em relação a outros testes de genotoxicidade, pois é um método rápido, simples, sensível para quantificação de baixos níveis de danos genéticos e necessita um pequeno número de células por amostra. Além disso, os resultados podem ser obtidos em um único dia e o custo para a realização da técnica é relativamente baixo. A sensibilidade do teste do Ensaio do Cometa em detectar danos em células individuais é comparável a outros métodos que avaliam danos em uma população de células (TICE et al., 2000).

Embora o teste seja amplamente aplicado, as técnicas de isolamento celular e condições do experimento variam consideravelmente. Muitas variáveis técnicas podem afetar a sensibilidade do teste, tais como a natureza química e o mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração e quantidade de agarose de baixo ponto de fusão, composição da solução de lise, tempo de lise, tempo de desnaturação alcalina do DNA, composição e temperatura do tampão de eletroforese, as condições de corrida, a coloração do DNA, entre outros (SPEIT et al., 1999; SPEIT & HARTMANN, 1999).

Este ensaio tem sido utilizado amplamente para avaliar danos e reparo no DNA induzidos por mutágenos e carcinógenos em uma variedade de células *in vivo* e *in vitro*, em testes de genotoxicidade, biomonitoramento ambiental e monitoramento de populações humanas expostas a agentes genotóxicos (SPEIT & HARTMANN, 1999). Portanto uma substância cometa positivo é considerada uma substância genotóxica. Contudo ela não pode ser considerada mutagênica, mas com potencial para ser mutagênica.

### **1.5 ENSAIO DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE**

Schmid (1975) e Heddle (1973) propuseram o Ensaio do Micronúcleo como uma alternativa aos ensaios citogenéticos tradicionais *in vivo* que objetivam detectar quebras cromossômicas (clastogênese) e/ou perda de cromossomos inteiros (aneugênese) causada por agentes químicos e físicos. O Ensaio do Micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico e na medula óssea representa hoje um dos melhores testes citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica (FENECH, 2000).

O Teste do Micronúcleo *in vitro* evoluiu rapidamente na área de genética toxicológica por ser um método simples e útil na avaliação de vários tipos de danos citogenéticos. Tal teste sofreu várias modificações inovadoras em seu protocolo e este fato aponta para uma ampliação da sua aplicabilidade (SALVADORI et al., 2003).

O micronúcleo (MN) origina-se durante a divisão celular proveniente de qualquer cromossomo que atrase na anáfase sendo incapaz de voltar ao fuso, ou de fragmentos cromossômicos. Um envoltório nuclear forma-se ao redor do cromossomo em atraso ou de fragmentos, os quais assumem a morfologia de um núcleo na interfase, porém menores do que o núcleo principal da célula (FENECH, 2000).

Fenech e Morley (1985) desenvolveram um método que bloqueia a citocinese, ou seja, a divisão do citoplasma, usando a citocalasina-B (Cyt-B), permitindo que possam ser distinguidas as células que tiveram uma divisão celular na cultura, daquelas que não se dividiram ou que dividiram mais de uma vez pela permanência dos núcleos-filhos em um mesmo citoplasma. Havendo a formação de micronúcleos, estes ficarão contidos no citoplasma da célula e quando são contados apenas nas células binucleadas indicam a formação durante o último ciclo celular (FENECH, 2000).

Este teste pode ser realizado *in vitro* com várias linhagens celulares, sendo eficiente para detectar efeitos clastogênicos e aneugênicos. Portanto uma substância micronúcleo positivo é considerada uma substância mutagênica (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

A análise dos MN pode ser feita para o diagnóstico de doenças hematológicas em células epiteliais da boca e do trato urinário (VILLELA et al., 2003); é útil no monitoramento de indivíduos expostos a agentes químicos e a radiação ionizante; serve para testar novos químicos que estão sendo sintetizados para ser lançados no mercado, identificar os agentes potencialmente mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos e identificar agentes antimutagênicos presente no meio ambiente (MALUF & ERDTMANN, 2003).

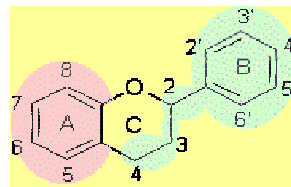
## **1.6 FITOESTRÓGENOS DA SOJA (*GLYCINE MAX*)**

O interesse da população e comunidade científica em torno dos benefícios dos fitoestrógenos sobre a saúde dos seres humanos, pela atuação como anticarcinógenos, cardioprotetores e como hormônios para a reposição hormonal na menopausa tem aumentado nos últimos tempos (KLEIN & KING, 2007).

A maior parte dos fitoestrógenos pertence a classe dos flavonóides. Os flavonóides são encontrados nos vegetais, nozes, frutas e bebidas derivadas de plantas como café, chá, óleo de oliva e vinho tinto, e em muitas ervas medicinais (*Silybum marianum*, *Alpina officinarum*, *Hypericum perforatum*) (HOLLMAN & KATAN, 1997). Os flavonóides são uma família de difenilpropanos, os quais são caracterizados estruturalmente por um esqueleto de carbono C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub> (Figura 01) (STOPPER et al., 2005). Vários compostos são formados através de combinações de grupos substituintes (hidroxil, metoxil) sobre o esqueleto

básico do flavonóide; deste modo o grupo dos flavonóides abrange os subgrupos: chalcona, flavona, flavonol, flavonona, flavanol, antocianina e isoflavona (MOON et al., 2006).

As flavononas ocorrem predominantemente nas frutas cítricas; as flavonas em ervas como salsa, aipo e tomilho; as antocianinas são pigmentos naturais, e suas maiores fontes são a uva, cereja e o repolho vermelho; o subgrupo flavonol tem como suas maiores fontes alimentos como, a cebola, o brócolis, a maçã, chá e vinho tinto; o subgrupo flavanol aparece predominantemente no cacau, chocolate, chá verde e vinho tinto; o subgrupo chalcona aparece no lúpulo que é usado na fabricação da cerveja; e as isoflavonas, que são os fitoestrógenos mais conhecidos, são encontradas abundantemente no grão de soja, mas também está presente na alfafa e em outras leguminosas (MOON et al., 2006).



**Figura 01** – Estrutura básica e sistema de numeração dos flavonóides

O grão de soja contém basicamente 3 tipos de isoflavonas que se apresentam normalmente em 4 diferentes formas, ou seja, forma glicosilada (daidzina, genistina e glicitina), forma acetilglicosilada (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina), forma malonilglicosilada (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina), e na forma estrutural não conjugada (daidzeína, genisteína e gliciteína) (ESTEVES & MONTEIRO, 2001).

Os açúcares das isoflavonas da soja são hidrolisados por enzimas de bactérias intestinais liberando as principais agliconas, daidzeína e genisteína. Estas são biotransformadas pelas bactérias intestinais e produzem os metabólitos: a) daidzeína é reduzida à dihidrodaidzeína a qual é metabolizada a equol e/ou O-desmetilangolensin (O-DMA); b) genisteína é reduzida à dihidrogenisteína e esta à 6'-hidroxi-O-DMA (COLDHAM et al., 2002; BEDANI & ROSSI, 2005).

Vários estudos têm demonstrado que uma dieta adequada pode contribuir para a saúde humana. Por este motivo, muitos alimentos e suplementos alimentares contendo fitoestrógenos estão sendo cada vez mais consumidos, mas infelizmente a concentração das substâncias ativas nem sempre é conhecida (STOPPER et al., 2005).

Estudos epidemiológicos apontam que a ingestão de alimentos ricos nesses fitoquímicos confere proteção contra várias formas de câncer (ADLEUCREUTZ et al., 2002). A população asiática que tradicionalmente tem um alto consumo de alimentos a base de vegetais, principalmente da soja, a incidência e mortalidade causada por câncer de mama e próstata tem sido menor em relação à população dos países ocidentais. Mesmo considerando que a genética e outros fatores do meio também contribuem para as diferenças observadas, a dieta incluindo o alto nível de consumo de fitoestrógenos tem sido o ponto crucial para reduzir a incidência de cânceres, principalmente os de mama e próstata (KLEIN & KING, 2007).

Alguns fitoestrógenos podem ser genotóxicos *in vitro*, ao passo que outros podem ser além de antígenotóxicos, anticarcinogênicos.

A transformação celular até o desenvolvimento de um tumor pode ser facilitada pelo aumento da proliferação celular estimulada por hormônio. Os fitoestrógenos mimetizam os estrógenos fisiológicos estruturalmente e funcionalmente podendo atuar como estimuladores da proliferação celular, mesmo tendo mostrado uma menor afinidade pelo receptor de estrógeno (ER) do que o próprio hormônio fisiológico, ou podem atuar como inibidores da proliferação celular na presença do estradiol por competir com este pela ligação ao ER, atuando como substâncias anticarcinogênicas. Assim os fitoestrógenos atuam como agonista ou antagonista no ER (STOPPER et al., 2005; THOMSEN et al., 2006; SEBASTIAN & THAMPAN, 2007). A genisteína pode modificar o risco ao câncer, não só por sua afinidade competitiva por receptores de estrógeno, mas também por atuar através de outras vias bioquímicas tais como apoptose, modificação do crescimento celular e algumas vias de sinalização (KLEIN & KING, 2007).

Existe uma crença que os fitoestrógenos não são hormônios, representando então um grande perigo para a recorrência de cânceres dependentes de estrógeno nas mulheres, que acabam por fazer seu uso de forma indiscriminada (STOPPER et al., 2005).

O câncer de próstata ocorre predominantemente em homens mais velhos e é um dos tipos de cânceres mais freqüentes nos países do ocidente. Ele está associado com o acúmulo de danos oxidativos no DNA combinado com o declínio da defesa antioxidativa no decorrer da idade (MALINS et al., 2001).

Raschke et al. (2006) demonstraram a proteção da genisteína contra o dano induzido pelo peróxido de hidrogênio no DNA de células da próstata linhagem LAPC-4, através da indução da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, restaurando então a defesa antioxidativa celular durante a idade.

O estresse oxidativo celular é um fator importante para desencadear várias doenças como, arteriosclerose, isquemia, trauma, doença de Alzheimer, Parkinson, AIDS e o próprio envelhecimento. Modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* demonstraram efeitos protetores dos flavonóides sobre o estresse oxidativo, portanto estes fitoquímicos podem ter efeitos benéficos no tratamento destas condições (ISHIGE et al., 2001).

A modulação de enzimas metabolizadoras de drogas que inativam ou detoxificam carcinógenos e o mecanismo de *scavenger* de radicais livres, são algumas das atividades protetoras dos flavonóides contra o câncer (MOON et al., 2006).

Efeitos adversos e genotoxicidade de fitoestrógenos têm sido relatados em estudos com animais, testes *in vitro* e em estudos clínicos em humanos (KLEIN & KING, 2007). Pesquisas em torno dos fitoestrógenos têm demonstrado que concentrações mais altas do que as doses usuais em dietas de alimentos ou suplementos da soja levam a ocorrência de efeitos genotóxicos sobre as células, como as apresentadas por Di Virgilio et al. (2004) em cultura de linhagem de células pulmonares de hamster V79 avaliando os efeitos genotóxicos das isoflavonas genisteína, daidzeína e equol, um metabólito da daidzeína.

A genisteína foi investigada para o seu potencial mutagênico e clastogênico *in vitro* pelo teste de Ames e células de linfoma de rato e, *in vivo*, através do ensaio do micronúcleo em ratos e camundongos. Os resultados observados mostraram que a genisteína não foi mutagênica *in vitro* no teste de Ames, nem mutagênica ou clastogênica *in vivo* com ratos e camundongos. No teste *in vitro* em células de linfoma de rato a genisteína induziu aumento predominante de pequenas colônias indicando uma ação clastogênica a este composto (McCLAIN et al., 2006).

Klein & King (2007) definiram através de estudos epidemiológicos e experimentais que as concentrações plasmáticas ótimas de genisteína em humanos devem ser menores ou iguais a 5  $\mu\text{M}$ , apresentando nestas dosagens efeitos benéficos como antimutágeno, antioxidante, inibição do crescimento celular através da inibição da tirosina-quinase entre outros.

## 2 JUSTIFICATIVA

Ultimamente vários estudos têm indicado que a ingestão de fatores moduladores dos mecanismos de defesa de um organismo, assim como a não exposição a agentes carcinogênicos, têm colaborado para a prevenção do câncer.

As enzimas hepáticas do citocromo P450 são conhecidas por metabolizar drogas, portanto a modulação destas enzimas pode influenciar o metabolismo de xenobióticos, produzindo efeitos farmacológicos e toxicológicos importantes. Muitos flavonóides são conhecidos por modular o sistema CYP450 (MOON et al., 2006), e desta forma atuar como quimioprotetores.

Esta estratégia preventiva é referida como quimioprevenção e pode ser conseguida através de uma suplementação na dieta com quimioprotetores derivados de produtos agrícolas ou através de agentes farmacológicos (PLEWA et al., 2001). Os produtos agrícolas como a soja, são fontes de grandes quantidades de antimutágenos, agentes que reprimem o potencial genotóxico ou a atividade de mutágenos ou carcinógenos (DE FLORA et al., 1998), por isso os esforços na identificação do potencial modulador do concentrado de isoflavonas da soja teste que pode determinar a estabilidade genômica e prevenir doenças.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar as propriedades moduladoras e quimioprotetoras dos fitoestrógenos da soja (*Glycine max*) fornecidos pela EMBRAPA-Soja, Londrina – PR (A) e dos adquiridos em uma farmácia de manipulação local (B) *in vitro* em células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), e *in vivo* em camundongos Swiss (*Mus musculus*) avaliar apenas o fitoestrógeno A.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Através do Ensaio de Citotoxicidade (MTT) determinar *in vitro* em células HTC, as concentrações dos fitoestrógenos da soja A e do B que serão utilizadas nos Ensaio do Cometa e Micronúcleo;

Investigar *in vitro* em células HTC, por meio do Ensaio do Cometa e do Micronúcleo, a indução de cometas e micronúcleos respectivamente, pelo tratamento com fitoestrógenos da soja A ou B;

Investigar *in vitro* em células HTC, a redução da frequência de células com cometas e micronúcleos, induzidos pelos agentes benzo[a]pireno ou bleomicina, fazendo uso dos fitoestrógenos A e B;

Investigar *in vivo* em camundongos, a indução de cometas e micronúcleos pelo tratamento com o fitoestrógeno da soja A;

Investigar *in vivo* em camundongos, a redução da frequência de células com cometas e micronúcleos, induzidos pelo agente ciclofosfamida, fazendo uso do tratamento com fitoestrógeno da soja A.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 FITOESTRÓGENOS DA SOJA (*GLYCINE MAX*)

Nos experimentos realizados *in vitro* foram avaliados dois fitoestrógenos da soja em pó, um dos fitoestrógenos foi fornecido pela EMBRAPA-Soja, Londrina – PR (A), e o outro fitoestrógeno da soja comprado em uma farmácia de manipulação local (B). Nos experimentos *in vivo* foi avaliado apenas o fitoestrógeno fornecido pela EMBRAPA-Soja, Londrina – PR (A).

O fitoestrógeno da soja A possui uma maior concentração das isoflavonas genistina e daidzina representadas pelos picos no cromatograma do anexo – 1 , e o fitoestrógeno da soja B possui um alto teor de daidzeína (25,75%) e daidzina (8,93%) como especificado no anexo – 2.

Os fitoestrógenos A e B foram dissolvidos a 1% em DMSO (Dimetilsulfóxido), diluídos em meio de cultura D-MEM/F-12 (Gibco) e esterilizados por filtração (Millex<sup>®</sup> - Millipore 0,22 µm) para os experimentos *in vitro*. Para uso nos animais experimentais o fitoestrógeno A foi diluído apenas em PBS.

### 4.2 INDUTORES DE DANO

Para o Ensaio de Citotoxicidade (MTT) foi utilizado a doxorrubicina (adriblastina - Pharmacia) como controle positivo da reação na concentração de 10 µg/mL, diluída em PBS.

Nos Ensaios do Cometa e Micronúcleo *in vitro* o dano ao DNA foi induzido pelo carcinógeno de ação indireta benzo[a]pireno (Fluka) na concentração de 20 µg/mL, previamente diluído em DMSO , em uma concentração de 0,8% em cultura. E como indutor de dano de ação direta utilizou-se a bleomicina (Fluka) na concentração de 0,5 µg/mL, esta foi diluída em meio de cultura DMEM-/F-12.

No experimento *in vivo* foi utilizado a ciclofosfamida (Acros Organics) como agente indutor de dano na concentração de 50mg/Kg, diluída em PBS.

#### **4.3 LINHAGEM CELULAR E OS ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO**

A linhagem de células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), utilizadas neste estudo foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). Estas foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM-/F-12 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco), e mantidas em estufa BOD a 37°C. Nestas condições, o ciclo celular desta linhagem é de aproximadamente 24 horas.

Os animais utilizados no experimento foram camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, pesando aproximadamente 30-40g. Os experimentos foram desenvolvidos com 8 grupos de camundongos, sendo um grupo para cada tratamento testado, constituídos cada um por 7 animais (para o Ensaio do Micronúcleo) e por 5 a 7 animais (para o Ensaio do Cometa).

#### **4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS NO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – MTT**

O Ensaio de Citotoxicidade (MTT) foi baseado no protocolo descrito pela primeira vez por Mossmann (1983).

Foi utilizada uma placa com 96 poços, onde os poços das colunas de 2 a 6 e 8 a 12 receberam 100 µL de meio de cultura com  $2,5 \times 10^4$  células, e os poços das colunas 1 e 7 receberam apenas 100 µL de meio sem soro e sem células. As células permaneceram em cultura por 24 horas para estabilização.

Após este período o meio de cultura da placa foi descartado e adicionou-se na linha A 200 µL da solução de meio de cultura com DMSO a 1% (controle negativo). A linha B recebeu 20 µL de doxorubicina (10 µg/mL) já contendo em cada poço 180 µL da solução de meio de cultura com DMSO (1%). Os poços das linhas C a H nas colunas de 1 a 6 receberam 200 µL de fitoestrógeno A e os poços das linhas C a H nas colunas de 7 a 12 receberam 200 µL de fitoestrógeno B por 24 horas.

Foram testadas 6 concentrações de cada fitoestrógeno : 1000  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 125  $\mu\text{g/mL}$ , 62,5  $\mu\text{g/mL}$  e 31,25  $\mu\text{g/mL}$ , dispostas na placa da seguinte maneira:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>	C <sup>-</sup>
B	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>	C <sup>+</sup>
C	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]
D	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]
E	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]
F	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]
G	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]
H	[6]	[6]	[6]	[6]	[6]	[6]	[6]	[6]	[6]	[6]	[6]	[6]



**Legenda:**

poços sem células

Linha A: DMSO+meio de cultura (controle negativo); linha B:doxorubicina 10  $\mu\text{g/mL}$ ; linha C-H/coluna de 1-6: fitoestrógeno A; linha C-H/coluna de 7-12: fitoestrógeno B; [1]: 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; [2]: 500  $\mu\text{g/mL}$ ; [3]: 250  $\mu\text{g/mL}$ ; [4]: 125  $\mu\text{g/mL}$ ; [5]: 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ; [6]: 31,25  $\mu\text{g/mL}$ .

Após 24 horas de tratamento, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) em cada poço. As células foram incubadas a 37°C por 4 horas.

Após foi retirado o MTT por completo dos poços, adicionado 100  $\mu\text{L}$  de DMSO/poço para diluir os cristais formados pelo MTT e a leitura realizada em espectrofotômetro com leitor de placas a 560 nm.

#### 4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS PARA O TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

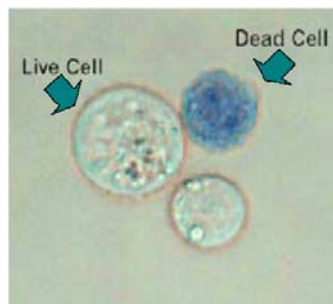
Juntamente com o Ensaio do Cometa foi realizado o Teste de Viabilidade Celular para cada tratamento.

Após o período de tratamento e tripsinização das células para a colheita do material, 20 µL da suspensão celular foi recolhida e misturada com 20 µL de azul de trypan (Gibco). A análise foi feita em microscópio óptico usando câmara de Neubauer, onde foram contadas células viáveis (brancas) e não viáveis (azuis) nos 4 quadrantes da câmara (Figura 02). O cálculo do Teste de Viabilidade Celular é feito pela somatória ( $\Sigma$ ) das células viáveis (CV), dividido pela somatória das células viáveis com as células não viáveis (CNV) e multiplicando-se tudo por 100.

Fórmula:

$$\frac{\Sigma CV}{\Sigma CV + CNV} \times 100$$

De acordo com o parâmetro utilizado em nosso laboratório, é considerado um resultado satisfatório, ou seja, o tratamento não foi citotóxico, quando a porcentagem de viabilidade celular é maior que 80%.



Fonte. [www.cropsci.uiuc.edu/faculty/plewa/FSHN380/lecture\\_notes/Lec03\\_handout.pdf](http://www.cropsci.uiuc.edu/faculty/plewa/FSHN380/lecture_notes/Lec03_handout.pdf) acesso 25/03/2007

**Figura 02** – Microscopia óptica de células após coloração com o azul de trypan (células mortas coraram em azul).

#### 4.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS NO ENSAIO DO COMETA *IN VITRO*

Foram semeadas em cada frasco de cultura  $10^6$  células HTC para realização dos experimentos, estas foram cultivadas por um ciclo celular (24 h) para estabilização da cultura. A seguir, foram realizados os tratamentos por 48 horas de acordo com os protocolos experimentais de genotoxicidade e antigenotoxicidade. As culturas foram divididas em: a. controle negativo; b. controle positivo; c. fitoestrógenos A e B; d. fitoestrógenos A e B + agente indutor de danos (bleomicina ou benzo[a]pireno). Os fitoestrógenos A e B foram testados em três concentrações determinadas previamente pelo Ensaio do MTT (item 5.1).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

<i>Controle negativo</i>	Estabilização	DMSO+MC	DMSO	Coleta
<i>Controle positivo</i>	Estabilização	DMSO+MC	Agente	Coleta
<i>Genotoxicidade</i>	Estabilização	Fitoestrógeno	DMSO	Coleta
<i>Antigenotoxicidade</i>	Estabilização	Fitoestrógeno	Agente	Coleta
	24 h	24 h	24 h	

##### 4.6.1 Coleta de células

Após o término dos tratamentos as células eram tripsinizadas (500  $\mu$ L de tripsina-EDTA 0,025%), centrifugadas e ressuspendidas em 0,5 mL de meio de cultura. Foi misturado 20  $\mu$ L de suspensão celular com 120  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP 0,5%) a 37°C, a qual foi depositada sobre uma lâmina pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%) a 60°C e levada para refrigeração por 20 min coberta com lamínula. Após remoção das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: 146,1g de NaCl 2,5 M, 37,2g de EDTA 100mM, 1,2g de Tris 10 mM, ~ 8,0g de NaOH sólido, 890 mL de H<sub>2</sub>O destilada) e mantidas em refrigerador por pelo menos 1 hora.

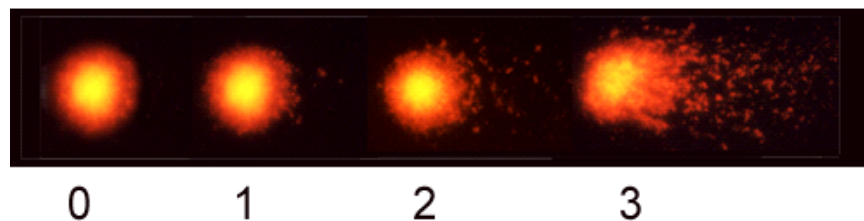
Em seguida as lâminas foram encaminhadas para a cuba de eletroforese com tampão pH > 13,0 (30 mL de NaOH 10N, 5 mL de EDTA 200 mM e H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1000 mL) a 4°C por 20 min para desnaturação do DNA. A eletroforese foi realizada a 4°C por 20 min, 25V e 300mA (1,5 V/cm). Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (48,5g de Tris 0,4 M e H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1000 mL) em 3 ciclos de 5 min, secas, fixadas em álcool absoluto por 10 min e guardadas para leitura.

#### 4.6.2 Coloração e análise das lâminas

Para a coloração, as lâminas foram cobertas com 100 µL de brometo de etídeo (0,002 mg/mL) e protegidas com lamínula.

A análise foi feita imediatamente após a coloração, em aumento de 400 X usando microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm.

Para cada cultura foram analisadas visualmente 100 células, em um total de 300 células para cada tratamento, classificando os cometas em: (a) tipo 0, ausência de cauda; (b) tipo 1, cauda com até o diâmetro da cabeça do cometa; (b) tipo 2, cauda de tamanho médio, com 2 vezes o diâmetro da cabeça; (c) tipo 3, cauda longa, com comprimento superior a 2 vezes o diâmetro da cabeça (Figura 03) (KOBAYASHI et al., 1995). Foram analisados apenas os cometas que apresentam núcleos de mesmo tamanho, e desprezados os núcleos apoptóticos (SPEIT et al., 1996).



Fonte. Luiz, 2002

**Figura 03** – Critério de classificação para a análise do Ensaio do Cometa. Classe 0 (sem dano), classe 1 (dano pequeno), classe 2 (dano médio) e classe 3 (dano grande).

#### 4.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS NO ENSAIO DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE ( *IN VITRO* )

Foram semeadas em cada frasco de cultura  $10^6$  células HTC para realização dos experimentos, estas foram cultivadas por um ciclo celular (24 h) para estabilização da cultura. A seguir, foram realizados os tratamentos de acordo com os protocolos experimentais de mutagenicidade e antimutagenicidade. As culturas foram divididas em: a. controle negativo; b. controle positivo; c. fitoestrógenos A e B; d. fitoestrógenos A e B + agente indutor de danos (bleomicina ou benzo[a]pireno). Foi adicionado juntamente com os agentes indutores de danos a citocalasina-B (cyt-B) em uma concentração final de 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em cultura para a obtenção de células binucleadas. Os fitoestrógenos A e B foram testados em três concentrações determinadas previamente pelo Ensaio do MTT (item 5.1).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

<i>Controle negativo</i>	Estabilização	DMSO+MC	DMSO+cyt-B	Coleta
<i>Controle positivo</i>	Estabilização	DMSO+MC	agente+ cyt-B	Coleta
<i>Mutagenicidade</i>	Estabilização	fitoestrógeno	DMSO+cyt-B	Coleta
<i>Antimutagenicidade</i>	Estabilização	fitoestrógeno	agente+ cyt-B	Coleta
	24 h	24 h	26 h	

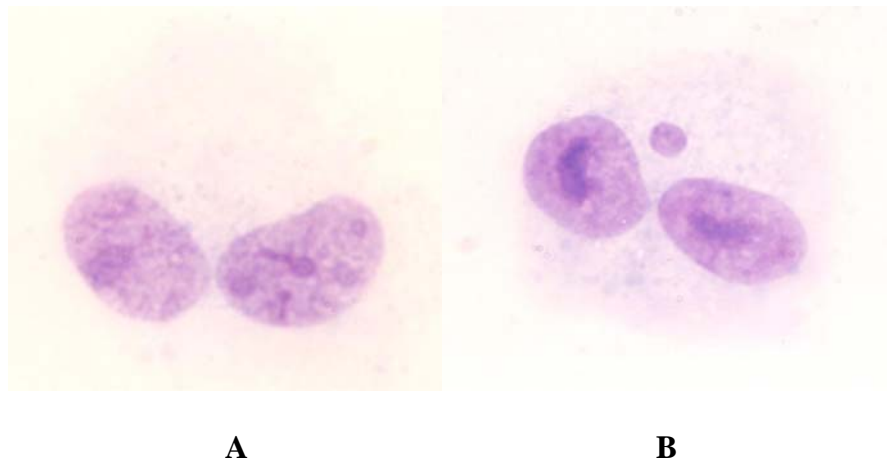
##### 4.7.1 Coleta das células

Para a coleta as células HTC foram tripsinizadas (500  $\mu\text{L}$  de Tripsina-EDTA 0,025%) por aproximadamente 2 min., hipotonizadas (citrato de sódio 1 %), fixadas com metanol-ácido acético (3:1) e depositadas sobre uma lâmina limpa e gelada contendo um filme de água, e deixou-se secar;

#### 4.7.2 Coloração e análise das lâminas

As lâminas foram coradas com Giemsa a 5% por 7 min. e a análise feita ao microscópio óptico no aumento de 400 X.

Foram analisadas 1000 células binucleadas por cultura, em um total de 3000 células por tratamento. Para a verificação de micronúcleos, foram avaliadas apenas as células binucleadas com citoplasma intacto, e contados os micronúcleos que apresentavam tamanho igual ou menor do que 1/3 do tamanho do núcleo, coloração igual a este, forma arredondada e que não estavam ligados ao núcleo principal (FENECH, 2000) conforme a Figura 04.



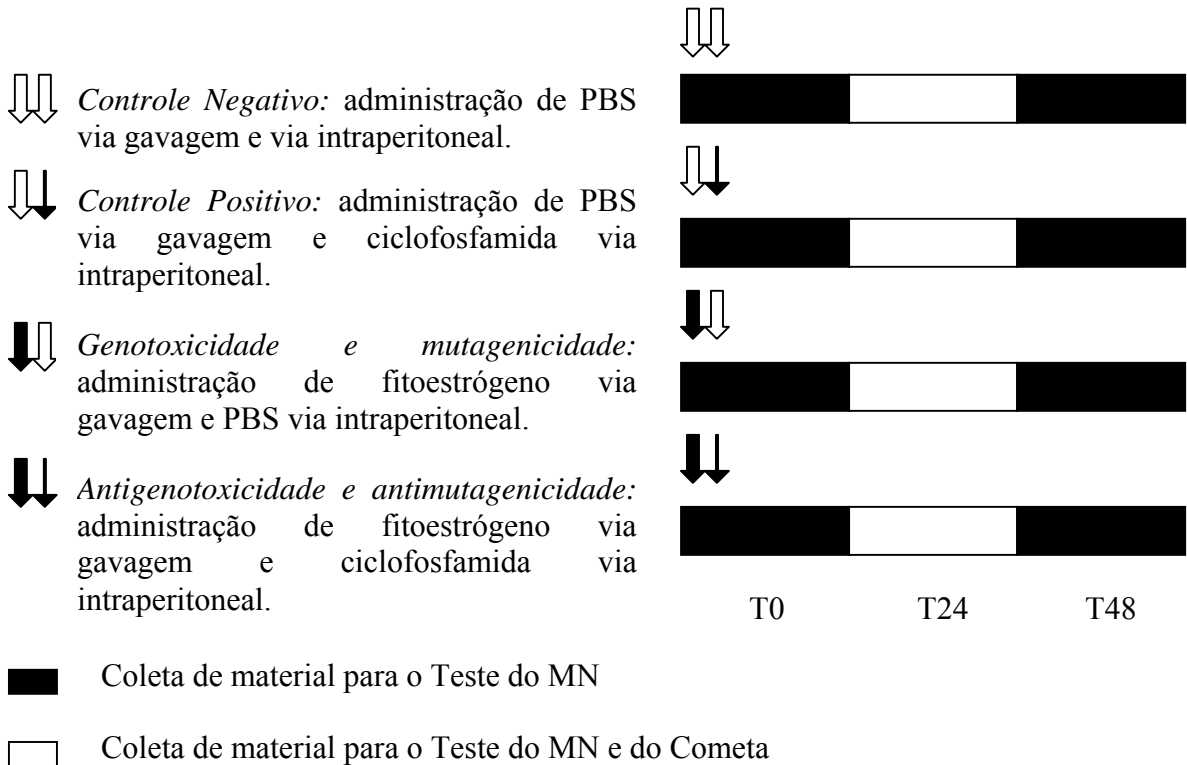
Fonte. Oliveira, 2001.

**Figura 04** – Células binucleadas sem micronúcleo (A) e com micronúcleo (B).

#### 4.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS PARA O ENSAIO DO COMETA E ENSAIO DO MICRONÚCLEO *IN VIVO*

Foram realizados os tratamentos dos animais de acordo com os protocolos experimentais de genotoxicidade, antigenotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade *in vivo*. Os grupos de animais foram divididos em: a. controle negativo; b. controle positivo; c. fitoestrógeno A; d. fitoestrógeno A + agente indutor de danos (ciclofosfamida). O fitoestrógeno A foi testado em três doses equivalentes às três concentrações testadas *in vitro*.

Todos os animais foram submetidos à eutanásia 48 horas após a aplicação dos tratamentos. Foram coletadas algumas gotas de sangue periférico por punção da veia caudal do animal para o teste do micronúcleo nos tempos T0 (antes da aplicação), T24 (24 horas após a aplicação) e T48 (48 horas após a aplicação). Para o teste do cometa, foram coletados aproximadamente 20  $\mu$ L de sangue periférico por punção da veia caudal do animal apenas em tempo T24.



#### 4.8.1 Procedimentos para o Ensaio do Cometa

Foram coletados 20  $\mu$ L de sangue periférico por punção da veia caudal do animal, que foram homogeneizados delicadamente com 120  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) à 37° C. Todas as demais etapas seguem o mesmo procedimento utilizado no experimento *in vitro* (item 4.6.1).

#### **4.8.2 Procedimentos para o Ensaio do Micronúcleo**

Foram coletadas algumas gotas de sangue periférico por punção da veia caudal do animal, que foram colocadas em lâmina pré-corada com alaranjado de acridina. As lâminas foram mantidas em freezer  $-20^{\circ}$  C, protegidas da luz, por pelo menos 24 horas antes da análise citológica. Foram analisados 2000 reticulócitos por animal utilizando microscópio de fluorescência.

#### **4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos *in vitro* e *in vivo* foram analisados no programa estatístico de análise de variância ANOVA, GraphPad InStat – [DATASET1.ISD], associado ao teste de Dunnet, com nível de significância a partir de 0,05.

## **5 RESULTADO**

### **5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE MTT**

O resultado da leitura do ensaio de citotoxicidade MTT medido espectrofotometricamente, mostrou que as concentrações 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL, após 24h de tratamento, tiveram uma absorvância equivalente ao controle negativo, ou seja, a quantidade do composto formazan formado pela reação colorimétrica do MTT foi semelhante ao controle. Ao passo que as concentrações 1000 µg/mL e 500 µg/mL foram citotóxicas, sendo diferentes estatisticamente do controle negativo do teste. Deste modo, utilizou-se as concentrações 250 µg/mL, 25 µg/mL e 2,5 µg/mL para o Ensaio do Cometa e do Micronúcleo *in vitro*.

### **5.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR**

O teste de viabilidade celular com azul de trypan realizado concomitantemente ao Ensaio do cometa, apresentou resultado satisfatório em todos os tratamentos, com viabilidade celular próxima de 95%; os fitoestrógenos A e B não afetaram a viabilidade celular após 48 horas de tratamento.

### **5.3 ENSAIO DO COMETA *IN VITRO***

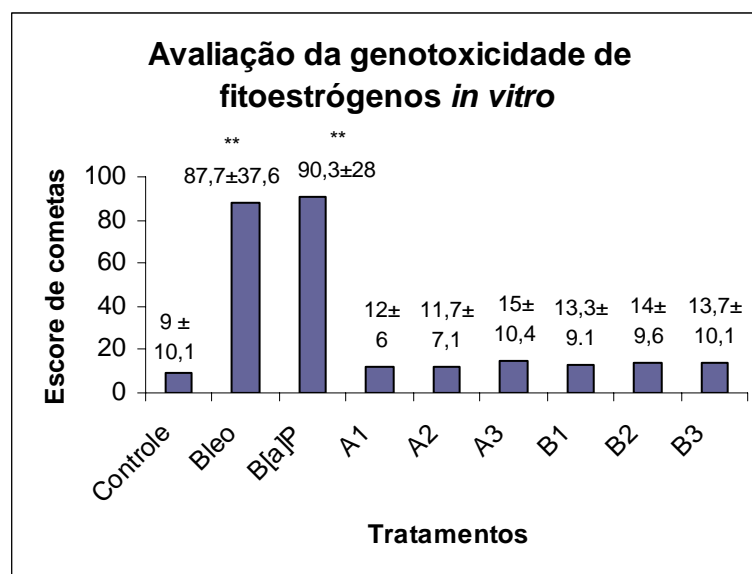
Na Tabela 01 e Figura 01 apresentamos os resultados obtidos nos diferentes tratamentos de genotoxicidade com os fitoestrógenos A e B. Os dados demonstram que houve uma pequena indução de cometas por parte dos extratos e os escores foram baixos, não apresentando diferença estatisticamente significativa. Os controles positivos, bleomicina e

benzo[a]pireno apresentaram uma distribuição de cometas concentrada principalmente na classe 1 (Tabela 01).

**Tabela 01** – Avaliação da genotoxicidade, no Ensaio do Cometa, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B.

Tratamentos	Número de células com cometas	Classes de Cometa				Escore
		0	1	2	3	
Controle	7.7 ± 8.0	92.3 ± 8.0	6.3 ± 6.0	1.3 ± 2.3	0.0 ± 0.0	9.0 ± 10.1
Bleo	66.7 ± 14.2**	33.3 ± 14.2	48.7 ± 10.6	15.0 ± 19.1	3.0 ± 2.6	87.7 ± 37.6**
B[a]P	70.3 ± 14.6**	29.7 ± 14.6	52.0 ± 16.4	16.7 ± 15.0	1.7 ± 1.5	90.3 ± 28.0**
A1	12.0 ± 6.0	88.0 ± 6.0	12.0 ± 6.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	12.0 ± 6.0
A2	11.7 ± 7.1	88.3 ± 7.1	11.7 ± 7.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	11.7 ± 7.1
A3	15.0 ± 10.4	85.0 ± 10.4	15.0 ± 10.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	15.0 ± 10.4
B1	12.3 ± 8.1	87.7 ± 8.1	11.7 ± 7.6	0.3 ± 0.6	0.3 ± 0.6	13.3 ± 9.1
B2	12.3 ± 8.1	87.7 ± 8.1	11.0 ± 7.0	1.0 ± 1.0	0.3 ± 0.6	14.0 ± 9.6
B3	12.7 ± 9.5	87.3 ± 9.5	11.7 ± 9.0	1.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0	13.7 ± 10.1

Bleo = bleomicina - 0,5 µg/mL; B[a]P = benzo[a]pireno - 20 µg/mL; A = fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; 1 = 2,5, 2 = 25 e 3 = 250 µg/mL; \*\*diferença estatística significativa em relação ao controle, P < 0.01.



**Figura 01** – Escore de cometas observado em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B. Bleo = bleomicina - 0,5 µg/mL; B[a]P = benzo[a]pireno - 20 µg/mL; A =

fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; 1 = 2,5, 2 = 25 e 3 = 250 µg/mL; \*\* diferença estatística significativa em relação ao controle, P < 0.01.

Na avaliação da antigenotoxicidade dos fitoestrógenos A e B, os dados demonstram que houve redução de danos tanto na associação com a bleomicina quanto com o benzo[a]pireno (Tabelas 02 e 03 respectivamente). A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa dos tratamentos com os fitoestrógenos em relação aos controles de indução de danos no DNA, sendo os escores de danos mais próximos do controle negativo (Figura 02).

**Tabela 02** – Avaliação da antigenotoxicidade, no Ensaio do Cometa, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com a bleomicina.

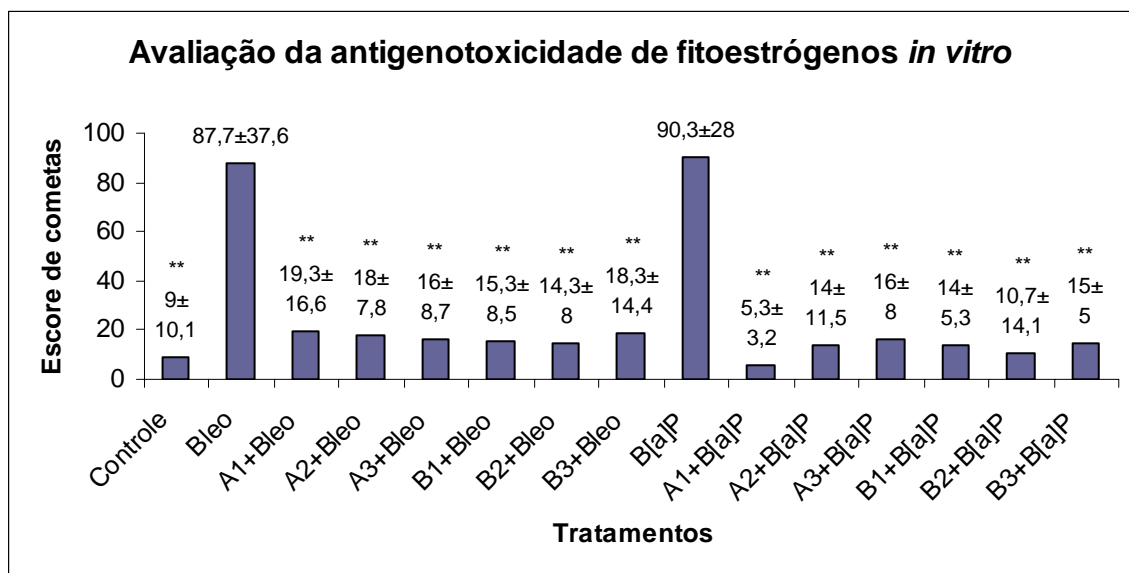
Tratamentos	Número de células com cometas	Classes de Cometa				Escore
		0	1	2	3	
<b>Controle</b>	7.7 ± 8.0**	92.3 ± 8.0	6.3 ± 6.0	1.3 ± 2.3	0.0 ± 0.0	9.0 ± 10.1**
<b>Bleo</b>	66.7 ± 14.2	33.3 ± 14.2	48.7 ± 10.6	15.0 ± 19.1	3.0 ± 2.6	87.7 ± 37.6
<b>A1 + Bleo</b>	17.3 ± 14.3**	82.7 ± 14.3	15.3 ± 12.0	2.0 ± 2.6	0.0 ± 0.0	19.3 ± 16.6**
<b>A2 + Bleo</b>	18.0 ± 7.8**	82.0 ± 7.8	18.0 ± 7.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	18.0 ± 7.8**
<b>A3 + Bleo</b>	15.3 ± 8.1**	84.7 ± 8.1	14.7 ± 7.5	0.7 ± 0.6	0.0 ± 0.0	16.0 ± 8.7**
<b>B1 + Bleo</b>	14.7 ± 7.5**	85.0 ± 8.0	14.7 ± 7.5	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	15.3 ± 8.5**
<b>B2 + Bleo</b>	14.3 ± 8.0**	85.7 ± 8.0	14.3 ± 8.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.3 ± 8.0**
<b>B3 + Bleo</b>	16.3 ± 12.7**	83.7 ± 12.7	14.3 ± 11.0	2.0 ± 1.7	0.0 ± 0.0	18.3 ± 14.4**

Bleo = bleomicina - 0,5 µg/mL; A = fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; 1 = 2,5, 2 = 25 e 3 = 250 µg/mL; \*\* diferença estatística significativa em relação à bleomicina, P < 0.01.

**Tabela 03** – Avaliação da antigenotoxicidade, no Ensaio do Cometa, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com o benzo[a]pireno.

Tratamentos	Número de células com cometas	Classes de Cometa				Escore
		0	1	2	3	
Controle	7.7 ± 8.0**	92.3 ± 8.0	6.3 ± 6.0	1.3 ± 2.3	0.0 ± 0.0	9.0 ± 10.1**
B[a]P	70.3 ± 14.6	29.7 ± 14.6	52.0 ± 16.4	16.7 ± 15.0	1.6 ± 1.5	90.3 ± 28.0
A1 + B[a]P	5.3 ± 3.2**	94.7 ± 3.2	5.3 ± 3.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.3 ± 3.2**
A2 + B[a]P	12.7 ± 9.5**	87.3 ± 9.5	11.3 ± 7.6	1.3 ± 2.3	0.0 ± 0.0	14.0 ± 11.5**
A3 + B[a]P	15.7 ± 7.5**	84.3 ± 7.5	15.3 ± 7.0	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	16.0 ± 8.0**
B1 + B[a]P	13.3 ± 5.8**	86.3 ± 5.5	13.3 ± 5.8	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	14.0 ± 5.3**
B2 + B[a]P	10.7 ± 14.1**	89.3 ± 14.1	10.7 ± 14.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.7 ± 14.1**
B3 + B[a]P	14.7 ± 4.5**	85.3 ± 4.5	14.3 ± 4.0	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	15.0 ± 5.0**

B[a]P = benzo[a]pireno - 20 µg/mL; A = fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; 1 = 2,5, 2 = 25 e 3 = 250 µg/mL; \*\* diferença estatística significativa em relação ao benzo[a]pireno, P < 0.01.



**Figura 02** – Escore de cometas observado em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com a bleomicina ou com o benzo[a]pireno. Bleo = bleomicina - 0,5 µg/mL; B[a]P = benzo[a]pireno - 20 µg/mL; A = fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; 1 = 2,5, 2 = 25 e 3 = 250 µg/mL; \*\* diferença estatística significativa em relação aos controles positivos (bleomicina e benzo[a]pireno), P < 0.01.

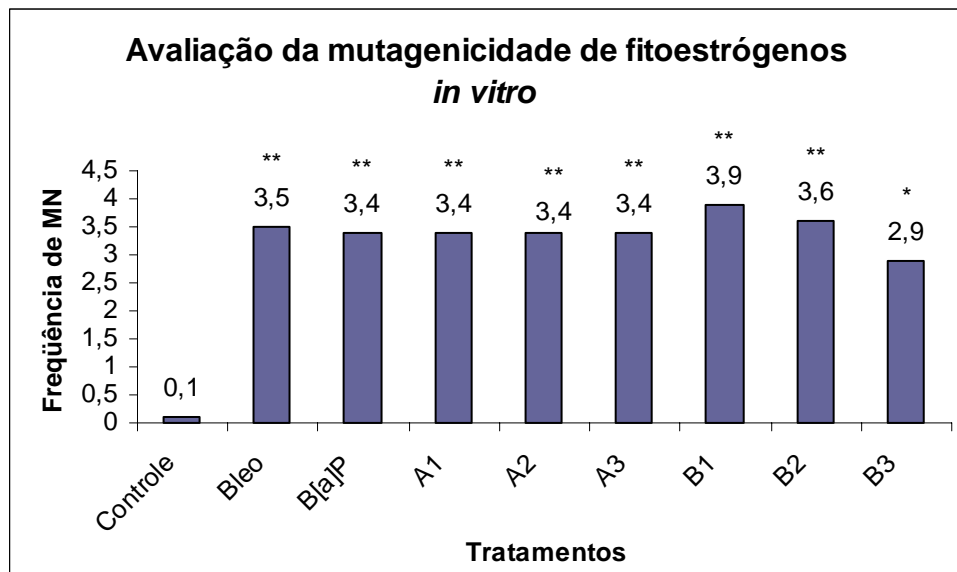
#### 5.4 TESTE DO MICRONÚCLEO *IN VITRO*

Os dados apresentados na Tabela 04 foram obtidos na análise da mutagenicidade dos fitoestrógenos A e B. Observamos que o número médio de células binucleadas com micronúcleo foi próximo aos controles positivos utilizados no experimento, bleomicina e benzo[a]pireno, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles, mas sim entre os tratamentos com os fitoestrógenos e o controle negativo. Portanto os fitoestrógenos foram mutagênicos para as três concentrações testadas nas células HTC. Na Figura 03 verificamos as frequências de micronúcleo que foram estatisticamente diferentes do controle negativo.

**Tabela 04** – Avaliação da mutagenicidade, no Ensaio do Micronúcleo, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B.

Tratamentos	Nº de células com MN	Frequência (%)	X ± DP
Controle	3	0.1	1.0 ± 1.0
Bleomicina	106	3.5	35.3 ± 5.5**
Benzo[a]pireno	103	3.4	34.3 ± 5.1**
A1	103	3.4	35.3 ± 10.7**
A2	102	3.4	34.0 ± 13.2**
A3	101	3.4	33.7 ± 15.7**
B1	117	3.9	39.0 ± 21.7**
B2	108	3.6	36.0 ± 12.2**
B3	86	2.9	28.7 ± 17.2*

Bleo = bleomicina - 0,5 µg/mL; B[a]P = benzo[a]pireno - 20 µg/mL; A = fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; 1 = 2,5, 2 = 25 e 3 = 250 µg/mL; \*diferença estatística significativa em relação ao controle negativo, P < 0.05; \*\*diferença estatística significativa em relação ao controle, P < 0.01.



**Figura 03** – Frequências de células binucleadas com MN observadas em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B. Bleo = bleomicina - 0,5 µg/mL; B[a]P = benzo[a]pireno - 20 µg/mL; A = fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; 1 = 2,5, 2 = 25 e 3 = 250 µg/mL; \* diferença estatística significativa em relação ao controle negativo,  $P < 0.05$ ; \*\* diferença estatística significativa em relação ao controle,  $P < 0.01$ .

Na Tabela 05 observamos que os fitoestrógenos A e B não foram protetores quando associados a bleomicina, assim como não protegeram da ação do benzo[a]pireno (Tabela 06), sendo o número médio de células binucleadas com micronúcleos próximo aos valores encontrados para os agentes indutores de danos. A Figura 04 apresenta as frequências de micronúcleos obtidas nos tratamentos de antimutagenicidade com os fitoestrógenos, na qual podemos observar que todos os tratamentos não foram protetores contra os mutágenos.

**Tabela 05** – Avaliação da antimutagenicidade, no Ensaio do Micronúcleo, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com a bleomicina.

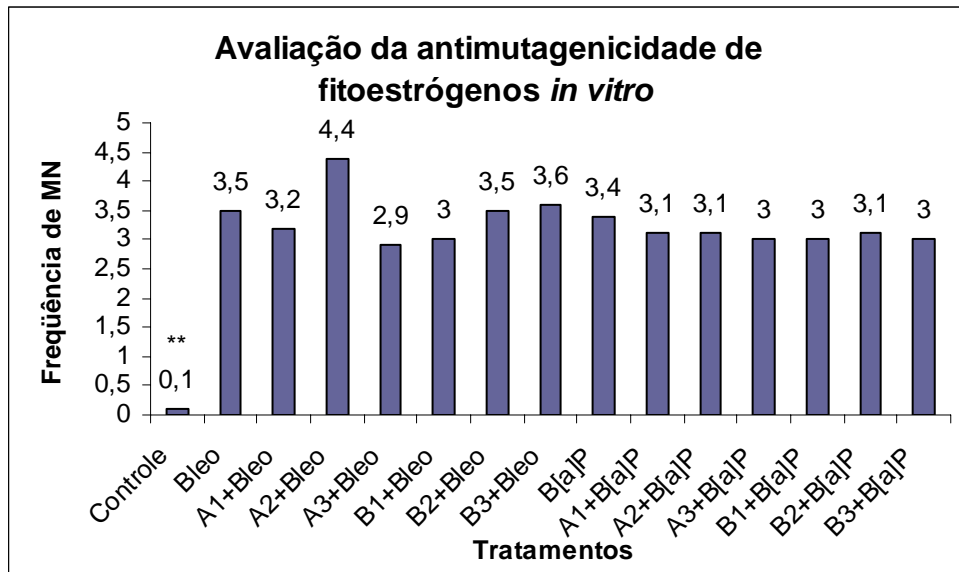
Tratamentos	Nº de células com MN	Frequência (%)	X ± DP
Controle	3	0.1	1.0 ± 1.0**
Bleomicina	106	3.5	35.3 ± 5.5
A1 + Bleo	97	3.2	32.3 ± 4.9
A2 + Bleo	132	4.4	44.0 ± 14.2
A3 + Bleo	86	2.9	28.7 ± 7.5
B1 + Bleo	90	3.0	30.0 ± 3.0
B2 + Bleo	105	3.5	35.0 ± 9.8
B3 + Bleo	109	3.6	36.3 ± 1.5

Bleo = bleomicina - 0,5 µg/mL; A = fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; 1 = 2,5, 2 = 25 e 3 = 250 µg/mL; \*\* diferença estatística significativa em relação à bleomicina, P < 0.01.

**Tabela 06** – Avaliação da antimutagenicidade, no Ensaio do Micronúcleo, em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com o benzo[a]pireno.

Tratamentos	Nº de células com MN	Frequência (%)	X ± DP
Controle	3	0.1	1.0 ± 1.0**
Benzo[a]pireno	103	3.4	34.3 ± 5.1
A1 + B[a]P	92	3.1	30.7 ± 3.0
A2 + B[a]P	93	3.1	31.0 ± 2.6
A3 + B[a]P	90	3.0	30.0 ± 2.6
B1 + B[a]P	90	3.0	30.0 ± 15.5
B2 + B[a]P	93	3.1	31.0 ± 11.3
B3 + B[a]P	91	3.0	30.3 ± 4.2

B[a]P = benzo[a]pireno - 20 µg/mL; A = fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; 1 = 2,5, 2 = 25 e 3 = 250 µg/mL; \*\* diferença estatística significativa em relação ao benzo[a]pireno, P < 0.01.



**Figura 04** – Frequências de células binucleadas com MN observadas em células HTC, tratadas com dois fitoestrógenos da soja A e B em associação com a bleomicina ou com o benzo[a]pireno. Bleo = bleomicina - 0,5 µg/mL; B[a]P = benzo[a]pireno - 20 µg/mL; A = fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; 1 = 2,5, 2 = 25 e 3 = 250 µg/mL; \*\* diferença estatística significativa em relação aos controles positivos (bleomicina e benzo[a]pireno),  $P < 0.01$ .

## 5.5 ENSAIO DO COMETA *IN VIVO*

Na avaliação da genotoxicidade do fitoestrógeno da soja A através do Ensaio do Cometa observada em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss machos, coletados 24 horas após o tratamento, os dados demonstram que este foi genotóxico nas três concentrações testadas, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (Tabela 07 e Figura 05).

Na Tabela 08 e Figura 05, observamos que após 24 horas de tratamento com o fitoestrógeno A associado à ciclofosfamida (avaliação da antigenotoxicidade), os leucócitos de sangue periférico dos camundongos apresentaram um número de células com danos e o escore menor em relação ao tratamento com a ciclofosfamida, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

**Tabela 07** – Avaliação da genotoxicidade, no Ensaio do Cometa, em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com o fitoestrógenos da soja A.

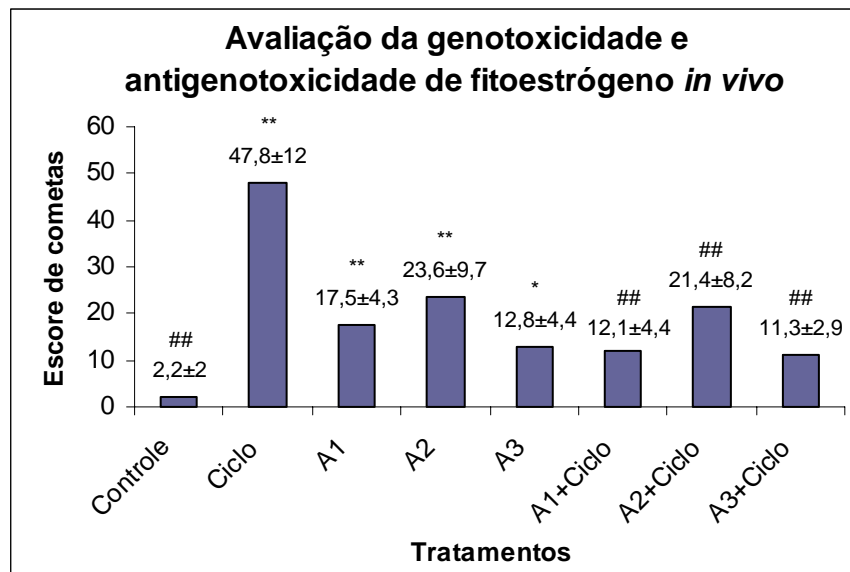
Tratamentos	Número de células com cometas	Classes de Cometa				Escore
		0	1	2	3	
<b>Controle</b>	2.2 ± 1.9	97.8 ± 1.9	2.2 ± 1.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2 ± 2.0
<b>Ciclo</b>	46.5 ± 11.0**	53.5 ± 11.0	45.2 ± 10.0	2.0 ± 1.1	0.0 ± 0.0	47.8 ± 12.0**
<b>A1</b>	17.0 ± 3.9**	83.0 ± 3.9	16.5 ± 3.7	1.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	17.5 ± 4.3**
<b>A2</b>	23.0 ± 9.3**	77.0 ± 9.3	22.4 ± 9.0	1.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	23.6 ± 9.7**
<b>A3</b>	12.8 ± 4.3*	87.2 ± 4.3	12.8 ± 4.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	12.8 ± 4.4*

Ciclo = ciclofosfamida - 50mg/kg; A = fitoestrógeno Embrapa; 1 = 0,083, 2 = 0,83, 3 = 8,3 mg/kg; \* diferença estatística significativa em relação ao controle, P < 0.05; \*\* diferença estatística significativa em relação ao controle, P < 0.01.

**Tabela 08** – Avaliação da antigenotoxicidade, no Ensaio do Cometa, em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com o fitoestrógenos da soja A associado com a ciclofosfamida.

Tratamentos	Número de células com cometas	Classes de Cometa				Escore
		0	1	2	3	
<b>Controle</b>	2.2 ± 1.9**	97.8 ± 1.9	2.2 ± 1.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2 ± 2.0**
<b>Ciclo</b>	46.5 ± 11.0	53.5 ± 11.0	45.2 ± 10.0	2.0 ± 1.1	0.0 ± 0.0	47.8 ± 12.0
<b>A1 + ciclo</b>	12.1 ± 4.4**	87.9 ± 4.4	12.1 ± 4.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	12.1 ± 4.4**
<b>A2 + ciclo</b>	20.3 ± 7.4**	79.1 ± 7.8	20.3 ± 7.4	1.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	21.4 ± 8.2**
<b>A3 + ciclo</b>	11.3 ± 2.9**	88.7 ± 2.9	11.3 ± 2.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	11.3 ± 2.9**

Ciclo = ciclofosfamida - 50mg/kg; A = fitoestrógeno Embrapa; 1 = 0,083, 2 = 0,83, 3 = 8,3 mg/kg; \*\* diferença estatística significativa em relação à ciclofosfamida, P < 0.01.



**Figura 05** – Escore de cometas observado em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com fitoestrógeno da soja A e em associação com a ciclofosfamida. Ciclo = ciclofosfamida - 50mg/kg; A = fitoestrógeno Embrapa; 1 = 0,083, 2 = 0,83, 3 = 8,3 mg/kg; \* diferença estatística significativa em relação ao controle,  $P < 0.05$ ; \*\* diferença estatística significativa em relação ao controle,  $P < 0.01$ ; ## diferença estatística significativa em relação à ciclofosfamida,  $P < 0.01$ .

## 5.6 TESTE DO MICRONÚCLEO *IN VIVO*

Os resultados obtidos de mutagenicidade do fitoestrógeno A, quando da coleta das células antes do tratamento (T0), 24 horas após o tratamento (T24) e 48 horas após o tratamento (T48) dos camundongos Swiss machos, demonstram que não houve diferença significativa em relação ao controle negativo, não sendo o fitoestrógeno A nas três concentrações e nos três períodos de coleta mutagênico (Tabela 09 e Figura 06).

Na Tabela 10 apresentamos o número de células com MN para a avaliação da antimutagenicidade do fitoestrógeno da soja A associado com a ciclofosfamida. A coleta de sangue periférico dos animais foi realizada antes do tratamento (T0), após 24 horas do tratamento (T24) e 48 horas após o tratamento (T48). Os dados demonstram que o fitoestrógeno possui ação antimutagênica *in vivo*, pois o número total de MN e o número médio de MN (Figura 06) nos tempos T24 e T48 foram diferentes estatisticamente do tratamento com a ciclofosfamida.

**Tabela 09** – Avaliação da mutagenicidade, no Ensaio do Micronúcleo, em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com o fitoestrógeno da soja A.

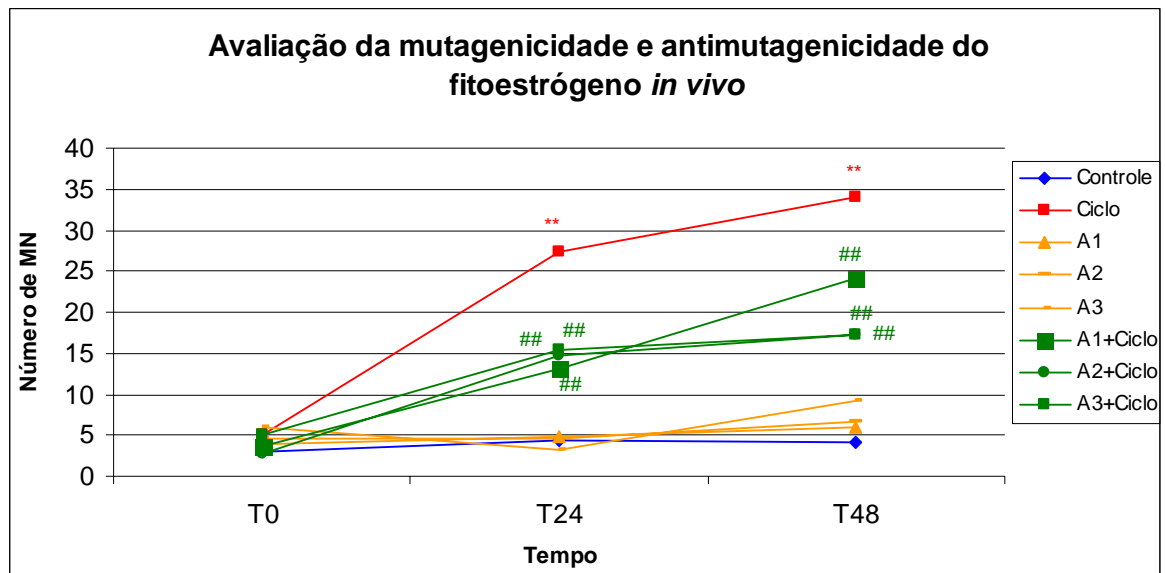
<b>Tratamentos</b>	<b>Tempo de coleta de sangue</b>	<b>Nº total de MN por tratamento</b>	<b>X ± DP</b>
<b>Controle</b>	T0	22	3.1 ± 0.9
	T24	10	4.4 ± 1.7
	T48	29	4.1 ± 2.1
<b>Ciclo</b>	T0	36	5.1 ± 2.2
	T24	191	27.3 ± 9.2**
	T48	238	34.0 ± 7.8**
<b>A1</b>	T0	28	4.0 ± 1.5
	T24	34	4.9 ± 2.4
	T48	41	5.9 ± 2.2
<b>A2</b>	T0	32	4.6 ± 2.4
	T24	32	4.6 ± 2.1
	T48	46	6.6 ± 2.4
<b>A3</b>	T0	41	5.9 ± 1.6
	T24	19	3.2 ± 2.3
	T48	65	9.3 ± 3.4

Ciclo = ciclofosfamida - 50mg/kg; A = fitoestrógeno Embrapa; 1 = 0,083, 2 = 0,83 , 3 = 8,3 mg/kg; T0 = coleta de sangue antes do tratamento, T24 = 24 h após o tratamento e T48 = 48 h após o tratamento; \*\* diferença estatística significativa em relação ao controle negativo, P < 0.01.

**Tabela 10** – Avaliação da antimutagenicidade, no Ensaio do Micronúcleo, em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com o fitoestrógeno da soja A associado com a ciclofosfamida.

Tratamentos	Tempo de coleta de sangue	Nº total de MN por tratamento	X ± DP
Controle	T0	22	3.1 ± 0.9
	T24	10	4.4 ± 1.7**
	T48	29	4.1 ± 2.1**
Ciclo	T0	36	5.1 ± 2.2
	T24	191	27.3 ± 9.2
	T48	238	34.0 ± 7.8
A1 + ciclo	T0	33	3.6 ± 1.0
	T24	92	13.1 ± 7.3**
	T48	169	24.1 ± 5.4**
A2 + ciclo	T0	19	2.7 ± 1.6
	T24	102	14.6 ± 5.9**
	T48	121	17.3 ± 7.9**
A3 + ciclo	T0	35	5.0 ± 2.0
	T24	107	15.3 ± 5.5**
	T48	121	17.3 ± 5.2**

Ciclo = ciclofosfamida - 50mg/kg; A = fitoestrógeno Embrapa; 1 = 0,083, 2 = 0,83, 3 = 8,3 mg/kg; T0 = coleta de sangue antes do tratamento, T24 = 24 h após o tratamento e T48 = 48 h após o tratamento; \*\* diferença estatística significativa em relação ao controle positivo, P < 0.01.



**Figura 06** – Número médio de células com micronúcleo observado em leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss tratados com o fitoestrógenos da soja A e em associação com a ciclofosfamida. Ciclo = ciclofosfamida - 50mg/kg; A = fitoestrógeno Embrapa; 1 = 0,083, 2 = 0,83, 3 = 8,3 mg/kg; T0 = coleta de sangue antes do tratamento, T24 = 24 h após o tratamento e T48 = 48 h após o tratamento; \*\* diferença estatística significativa em relação ao controle negativo, P < 0.01; ## diferença estatística significativa em relação ao controle positivo, P < 0.01.

## 5.7 RESUMO DOS RESULTADOS

Na Tabela 11, temos uma representação geral dos resultados obtidos com os diversos tratamentos nos Ensaio do Cometa e MN *in vitro* e *in vivo*. Os fitoestrógenos A e B *in vitro* não foram genotóxicos, porém mutagênicos. Em associação com os agentes indutores de danos estes fitoestrógenos apresentaram antigenotoxicidade e não apresentaram antimutagenicidade. Nos testes *in vivo*, o fitoestrógeno A foi genotóxico, porém não mutagênico. Em associação com a ciclofosfamida o fitoestrógeno A se apresentou antigenotóxico e antimutagênico.

**Tabela 11** – Representação geral dos resultados obtidos nos Ensaio do Cometa e Micronúcleo *in vitro* e *in vivo*.

Tratamentos	Teste <i>in vitro</i>		Teste <i>in vivo</i>	
	Cometa	MN	Cometa	MN
<b>A</b>	Não genotóxico	Mutagênico	Genotóxico	Não mutagênico
<b>B</b>	Não genotóxico	Mutagênico	-----	-----
<b>A + Bleo</b>	Protetor	Não protetor	-----	-----
<b>B + Bleo</b>	Protetor	Não protetor	-----	-----
<b>A + B[a]P</b>	Protetor	Não protetor	-----	-----
<b>B + B[a]P</b>	Protetor	Não protetor	-----	-----
<b>A + Ciclo</b>	-----	-----	Protetor	Protetor

A = fitoestrógeno Embrapa; B = fitoestrógeno de manipulação; Bleo = bleomicina - 0,5 µg/mL; B[a]P = benzo[a]pireno - 20 µg/mL; Ciclo = ciclofosfamida - 50mg/kg.

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente existe o interesse na identificação de substâncias presentes no meio que possuem atividade protetora contra mutações, a fim de resguardar as gerações futuras. Atividades antimutagênicas e anticarcinogênicas têm sido atribuídas a vários constituintes da dieta alimentar, deste modo, a ingestão de compostos quimiopreventivos pode melhorar a proteção contra danos causados por xenobióticos (RIBEIRO & SALVADORI, 2003; STOPPER et al., 2005). Dietas ricas em fitoestrógenos podem contribuir para o controle de muitas doenças crônicas, inclusive o câncer (ESTEVES & MONTEIRO, 2001). No entanto, níveis inadequados da ingestão destes fitoquímicos podem levar a genotoxicidade (KLEIN & KING, 2007).

Neste estudo três diferentes concentrações de fitoestrógenos da soja foram avaliadas *in vitro* e *in vivo* para genotoxicidade e antigenotoxicidade através do Ensaio do Cometa, e para mutagenicidade e antimutagenicidade através do Ensaio do Micronúcleo. Os fitoestrógenos A e B não foram genotóxicos *in vitro*. Entretanto, os fitoestrógenos foram mutagênicos, apresentando aumento no número de micronúcleos em células binucleadas. Em associação com os agentes indutores de danos, bleomicina ou benzo[a]pireno, os fitoestrógenos A e B apresentaram antigenotoxicidade mas não apresentaram antimutagenicidade. Nos testes *in vivo* foi testado apenas o fitoestrógeno A que foi genotóxico causando danos no DNA, porém não mutagênico. Em associação com a ciclofosfamida, o fitoestrógeno A apresentou-se protetor contra este mutágeno na avaliação pelo Ensaio do Cometa e pelo Ensaio do Micronúcleo.

Testes de citotoxicidade são amplamente usados em estudos de toxicologia *in vitro* para determinar as doses citotóxicas de uma substância após exposição das células (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). As concentrações dos fitoestrógenos utilizadas no Ensaio do Cometa e no Ensaio do MN foram determinadas previamente pelo Teste de Citotoxicidade MTT e este excluiu as doses tóxicas dos fitoestrógenos deixando apenas as não citotóxicas para serem avaliadas quanto à genotoxicidade e mutagenicidade. Deste modo, podemos ter uma maior segurança para a posterior análise dos resultados de indução de danos ao DNA da substância teste, caso contrário um resultado não genotóxico poderá ser um falso-negativo, ou seja, a substância foi citotóxica a ponto de não haver tempo hábil para se verificar o dano genotóxico.

Para definir as concentrações fisiológicas relevantes das isoflavonas, é importante conhecer o seu metabolismo. As isoflavonas da soja são encontradas naturalmente na forma glicosilada (ligadas a açúcares) que é inativa; após a ingestão, enzimas hidrolíticas de bactérias intestinais desconjugam a molécula de açúcar produzindo as agliconas que são facilmente absorvidas. As agliconas são então metabolizadas no fígado e sofrem recirculação entero-hepática. As formas conjugadas são excretadas primariamente na urina e as não conjugadas são excretadas nas fezes (ESTEVES & MONTEIRO, 2001; SETCHELL et al., 2002).

Os resultados obtidos com fitoestrógenos em sistema teste *in vitro* não devem predizer os efeitos dos fitoestrógenos *in vivo*, pois já existem diferenças no metabolismo gastrointestinal dos fitoestrógenos entre indivíduos, espécies e sexo, que podem ser críticas para determinar a eficácia destes compostos, quanto mais em sistemas testes diferentes (KLEIN & KING, 2007). Alguns fitoestrógenos tais como, apigenina, naringenina e crisina, demonstram ser inibidores da aromatase *in vitro*, mas não são capazes de inibi-la *in vivo* (SAARINEN et al., 2001), isto pode ser devido à fraca absorção e/ou biodisponibilidade do fitoestrógeno (MOON et al., 2006). A naringenina é um inibidor da hidroxilase do benzo[a]pireno (AHH) *in vitro*, enquanto *in vivo* é a naringina que inibe a atividade da AHH (UENG et al., 1999). Análises *in vitro* têm demonstrado efeito clastogênico da genisteína e danos no DNA, ao passo que testes *in vivo* têm resultado em genotoxicidade negativa (McCLAIN et al., 2006). As diferenças observadas no nosso estudo *in vitro* e *in vivo* (fitoestrógenos mutagênicos *in vitro*, porém não *in vivo*) e em outros estudos podem ser relacionadas com a diferença na formação de metabólitos (MOON et al., 2006), e ainda deve-se levar em consideração que a concentração e as características cinéticas de alguns compostos do meio de cultura não são completamente comparáveis ao plasma, como por exemplo, as proteínas. Portanto, deve-se ter cautela ao extrapolar dados de estudos *in vitro* para situações *in vivo* (VAN MEEUWEN et al., 2007).

Através do Ensaio do Cometa são verificados danos no DNA que ainda podem ser reparados, lesões genômicas recentes, mas não cromossômicas. O Teste do MN verifica mutações cromossômicas que já estão instaladas, lesões que não são passíveis de reparo podendo ser de origem clastogênica ou aneugênica (FENECH, 2000; GONTIJO & TICE, 2003). No presente trabalho, as três concentrações dos fitoestrógenos causaram mutações nas células HTC evidenciadas pelo aumento no número de MN, porém lesões genômicas estatisticamente significativas não foram encontradas no Ensaio do Cometa, talvez pelo fato do sistema de reparo livre de dano ter agido neste período. Segundo Di Virgilio et al.

(2004), o Teste do MN parece ser mais sensível em detectar danos induzidos por isoflavonas do que o Teste do Cometa, porque neste a genisteína induziu cometas em células de hamster chinês V79 apenas em concentrações iguais ou superiores a 250  $\mu\text{M}$ , entretanto, no Ensaio do MN a genisteína induziu um aumento no número de MN em concentrações bem menores que variaram de 5 a 25  $\mu\text{M}$ . Este estudo também mostrou uma queda no número de MN em concentrações acima de 25  $\mu\text{M}$  de genisteína, provavelmente devido à toxicidade celular.

A utilização de dois testes complementares, como é o caso de detecções de pré-lesões no DNA e a formação de MN, é de grande valia em mutagênese permitindo uma melhor definição do potencial mutagênico de uma substância. Isso fica evidenciado em nossos dados no qual temos um resultado negativo para cometa, mas positivo para micronúcleo *in vitro*. Por isso a importância da utilização de baterias de testes *in vivo* e *in vitro* além de diferentes parâmetros na avaliação de um fármaco (SNYDER & GREEN, 2001; KIRKLAND, et al., 2007; THYBAUD et al., 2007).

Efeitos adversos e genotoxicidade de fitoestrógenos têm sido relatados em estudos com animais, testes *in vitro* e em estudos clínicos em humanos (KLEIN & KING, 2007). Os dados obtidos de MN positivo *in vitro* demonstram a preocupação da utilização desses fitoestrógenos pela população, porém os dados negativos *in vivo* são tranquilizadores. Contudo, os dados de cometa positivo *in vivo* preocupam uma vez que apesar desses danos não se transformarem em mutações (MN), sugerindo eficiência do sistema de reparo, não podemos esquecer que a maioria das neoplasias é decorrente de mutações genômicas que surgiram por troca de pares de base, deleção ou adição, muitas vezes decorrentes do próprio sistema de reparo inadequado. O envolvimento de mutações cromossômicas com o processo de neoplasias é menos freqüente e mais evidente em fases adiantadas da carcinogênese (PINTO & FELZENSZWALB, 2003).

MacClain et al. (2006) observaram que o fitoestrógeno genisteína não foi mutagênico *in vitro* no teste de Ames, nem mutagênico ou clastogênico *in vivo* com ratos e camundongos. No teste *in vitro* em células de linfoma de rato a genisteína induziu aumento predominante de pequenas colônias indicando uma ação clastogênica a este composto. Em nosso trabalho também observamos nos dois sistemas utilizados diferenças na resposta, demonstrando que o tipo celular analisado interfere na resposta, uma vez que *in vivo* analisamos células sanguíneas e *in vitro* células hepáticas, sugerindo que tecidos diferentes respondem também diferentemente a ação desses fitoestrógenos. Um outro dado é que não encontramos diferença entre os fitoestrógenos testados *in vitro*, mesmo estes apresentando

concentrações distintas de isoflavonas, onde o fitoestrógeno A possui um alto teor da isoflavona genistina (forma glicosilada), que é a forma inativa (anexo – 1) e o fitoestrógeno B uma maior concentração da daidzeína (aglicona), que é a forma ativa e facilmente absorvida (anexo – 2).

No Ensaio do Cometa *in vitro* encontramos em algumas situações o padrão de dose-resposta na indução de cometas, como por exemplo, no tratamento com fitoestrógeno B associado ao benzo[a]pireno. No Ensaio do MN *in vitro* não foi possível encontrar um padrão de dose-resposta mesmo utilizando concentrações em intervalos de múltiplo de 10. Já os ensaios *in vivo* apresentaram a relação dose-resposta, com exceção da maior concentração do fitoestrógeno no Teste do Cometa, podendo ser uma indicação de citotoxicidade do fitoestrógeno nesta concentração.

Muitos estudos erroneamente utilizam a redução no número de mutações ou de aberrações cromossômicas como indicadores de antimutagenicidade, mesmo quando as substâncias testadas apresentem efeitos como morte celular ou inibição mitótica. Um fator complicador ocorre quando substâncias ditas antimutagênicas em um sistema teste são também mutagênicas no mesmo, ou em outros sistemas testes (ZEIGER, 2007). Esse é o caso dos fitoestrógenos estudados nesse trabalho no qual encontramos tanto *in vitro* quanto *in vivo* esse tipo de ação ambígua. Um dos critérios para nomear uma substância como antimutagênica é a determinação da toxicidade da substância teste, do mutágeno de referência e do tratamento combinado dos dois, pois efeitos citotóxicos podem inibir o aparecimento de mutações e assim confundir com ação antimutagênica (ZEIGER, 2007).

Os fitoestrógenos atuam como antimutágenos modulando enzimas metabolizadoras de xenobióticos, e deste modo inibem a ativação de promutágenos (FERGUSON et al., 2004). Esse pode ser o caso observado *in vivo* no qual houve redução dos efeitos mutagênicos da ciclofosfamida, um agente de ação indireta que provoca danos no DNA somente após metabolização. Porém não sabemos ao certo, *in vitro*, como a presença de um fitoestrógeno modificaria a resposta celular de um agente genotóxico, mas é possível que essa modificação seja inespecífica, uma vez que tanto em associação com o benzo[a]pireno (agente químico de ação indireta) como com a bleomicina (agente de ação direta) houve redução dos danos causados no DNA pelo Ensaio do Cometa.

A ação antígenotóxica dos fitoestrógenos associados a um agente que danifica o DNA, o qual pode estar presente na dieta, como é o caso do benzo[a]pireno utilizado no tratamento *in vitro*, é um efeito biológico desejável. Recentemente, foi relatado que uma suplementação na dieta com isoflavonas da soja diminui as lesões oxidativas no

DNA humano e também sugere que isto possa ser o possível mecanismo protetor destes compostos na prevenção do câncer (DJURIC et al., 2001). A soja faz parte integral da dieta asiática tradicional e está associada com o menor risco de câncer de próstata nos homens asiáticos. Os produtos de soja são fontes ricas de isoflavonas, e a ingestão diária de isoflavona nos países da Ásia pode ultrapassar 40 mg / dia , pelo menos 10 vezes mais que nos países americanos (BOERSMA et al., 2001). Deste modo a dieta incluindo o alto consumo de fitoestrógenos tem colaborado significativamente para reduzir a incidência de câncer (KLEIN E KING, 2007). Contudo a sua ação antimutagênica em relação a um agente anti-neoplásico, como é o caso da ciclofosfamida observado no tratamento *in vivo*, seria um efeito indesejável para um paciente que esteja passando por quimioterapia, devendo este interromper a utilização do fitoestrógeno para não interferir com o tratamento quimioterápico.

O acúmulo de dados da literatura decorrentes de estudos epidemiológicos e experimentais tem permitido o aprofundamento do entendimento dos mecanismos de ação dos fitoestrógenos, contudo ainda é necessário que novos estudos possam compreender a interação dessas moléculas na biologia celular e suas conseqüências para a saúde humana.

## REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens and cancer. **Lancet Oncology**, v. 3, p. 364-373, 2002.
- ALBERTINI, R.J; ANDERSON, D; DOUGLAS, F.R; HAGMAR, K.H; MERLO, F; NATARAJAN, A.T; NORPPA, H; SHUKER, D.E.G; TICE, R; WATERS, M.D; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.
- ANDERSON, K; ANDREWS, R; YIN, L; MCLEOD, R; MACDONALD, C; HAYES, J.D; GRANT, M.H. Cytotoxicity of xenobiotics and expression of glutathione-S-transferases in immortalized rat hepatocyte cell lines. **Human & Experimental Toxicology**, v. 17, p. 131-137, 1998.
- BEDANI, R. & ROSSI, E.A. ISOFLAVONAS: Bioquímica, Fisiologia e Implicações para a saúde. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, nº 2 , 2005.
- BOERSMA, B.J; BARNES, S; KIRK, M; WANG, C.C; SMITH, M; KIM, H; XU, J; PATEL, R; DARLEY-USMAR, V.M. Soy isoflavonoids and cancer – metabolism at the target site. **Mutation Research**, v. 480- 481, p. 121- 127, 2001.
- BRUSICK, D.J. **Principles of genetic toxicology**. New York: Plenum Press, 1987, 2 ed.
- COLDHAM, N.G; DARBY, C; HOWS, M; KING, L.J; ZHANG, A.Q; SAUER, M.J. Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism. **Xenobiotica**, v. 32, p. 45-62, 2002.
- CONNAY, A.H. Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the Seventh DeWitt S. Goodman Lecture. **Cancer Research**, v. 63, p.7005-7031, 2003.
- DE FLORA, S. & RAMEL, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis: classification and overview. **Mutation Research**, v. 202, p. 285-306, 1988.
- DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 402, p. 151-158, 1998.

DE FLORA, S; IZZOTTI, A; D'AGOSTINI, F; BALANSKY, R.M; NOONAN, D; ALBINI, A. Multiple points of intervention in the prevention of câncer and other mutation-related diseases. **Mutation Research**, v. 480-481, p. 9-22, 2001.

DE FLORA, S. & FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Reserch**, v. 591, p. 8-15, 2005.

DI VIRGILIO, A.L; IWAMI, K; WÄTJEN, W; KAHL, R; DEGEN, G. H. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 151-162, 2004.

DJURIC, Z; CHEN, G; DOERGE, D.R; HEILBRUN, L.K; KUCUK, O. Effects of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. **Cancer Letters**, v. 172, p. 1- 6, 2001.

ERDTMANN, B.A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J; ERDTMANN, B; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, cap. 1, p. 23-46.

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

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

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERGUSON, L.R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Research**, v. 307, p. 395-410, 1994.

FERGUSON, L.R; PHILPOTT, M; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, v. 198, p. 147-159, 2004.

FOTAKIS, G. & TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-177, 2006.

GONTIJO, A.M.M.C. & TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ulbra, 2003, cap. 10, p. 247-271.

HOLLMAN, P.C. & KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305-310, 1997.

[http://www.cropsci.uiuc.edu/faculty/plewa/FSHN380/lecture\\_notes/Lec03\\_handout.pdf](http://www.cropsci.uiuc.edu/faculty/plewa/FSHN380/lecture_notes/Lec03_handout.pdf)

ISHIGE, K; SCHUBERT, D; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, p. 433-446, 2001.

KADA, T; INOUE, T; NAMIKI, N. Environmental desmutagens and antimutagens. In: E. J. KLEKOWSKI (Ed.). **Environmental Mutagenesis and Plant Biology**, Praeger, New York, 1982, p. 137- 151.

KADA, T. & SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens: Their modes of action. **Bio Essays**, v. 7, p. 113-115, 1987.

KASSIE, F; SUNDERMANN, V.M; EDENHARDER, R; PLATT, K.L; DARROUDI, F; LHOSTE, E; HUMBOLT, C; MUCKEL, E; UHL, M; KUNDI, M; KNASMÜLLER, S. Development and application of test methods for the detection of dietary constituents which protect against heterocyclic aromatic amines. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 183-192, 2003.

KIRKLAND, D.J; AARDEMA, M; BANDUHN, N; CARMICHAEL, P; FAUTZ, R; MEUNIER, J.R; PFUHLER, S. *In vitro* approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive *in vitro* genotoxicity results. **Mutagenesis**, v. 22, p. 161-175, 2007.

KLEIN, C.B. & KING, A.A. Genistein genotoxicity: Critical considerations of *in vitro* exposure dose. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, p. 1-11, 2007.

KOBAYASHI, H; SUGIYAMA, C; MORIKAWA, Y; HAYASHI, M; SOFUNI, T.A. comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KURODA, Y; JAIN, A.K; TEZUKA, H; KADA, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 201- 209, 1992.

LEE, B.M. & PARK, K.K. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 265-278, 2003.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, p. 955, 2001.

LORGE, E; GERVAIS, V; LHOTE-BECOURT, N; MAISONNEUVE, C; DELONGEAS, J. L; CLAUDE, N. Genetic toxicity Assessment: Employing the best science for human safety evaluation part IV: A strategy in genotoxicity testing in drug development: some examples. **Toxicological Sciences**, v. 98, p. 39-42, 2007.

LUIZ, R.C. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei* Murill (Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, *in vitro*. 2002. 80f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

MAJER, B.J; MERSH-SUNDERMANN, V; DARROUDI, F; LAKY, B; WIT, K; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. **Mutation Research**, v. 551, p. 153–166, 2004.

MALINS, D.C; JOHNSON, P.M; WHEELER, T.M; BARKER, E.A; POLISSAR, N.L; VINSON, M.A. Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer. **Cancer Research**, v. 61, p. 6025-6028, 2001.

MALUF, S.W; ERDTMANN, B. Biomonitorização do dano genético em humanos. In: SILVA, J; ERDTMANN, B; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, cap. 9, p. 183-203.

MCCLAIN, R.M; WOLZ, E; DAVIDOVICH, A; BAUSCH, J. Genetic toxicity studies with genisteína. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 42-55, 2006.

MERSH-SUNDERMANN, V; KNASMÜLLER, S; WU, X; DARROUDI, F; KASSIE, F. Use of human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, v. 198, p. 329-340, 2004.

MOON, Y.J; WANG, X; MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 187-210, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

OLIVEIRA, J.M. Efeito protetor do extrato aquoso do Cogumelo-do-Sol (*Agaricus blazei* MURRIL, ABL99/26), na genotoxicidade do metilmetanosulfonado, em células V79. 2001.78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.

OLIVEIRA, J.M; JORDÃO, B.Q; RIBEIRO, L.R; EIRA, A.F; MANTOVANI, M.S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1775-1780, 2002.

OLIVEIRA, R.J; RIBEIRO, L.R; DA SILVA, A.F; MATUO, R; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in vitro**, v. 20, p. 1225-1233, 2006 .

PINTO, L.F.R. & FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: RIBEIRO, L.R; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental.**, Canoas: Ulbra, 2003, cap. 2, p. 29-44.

PLEWA, M.J; BERHOW, M.A; VAUGHN, S.F; WOODS, E.J; RUNDELL, M; NASCHANSKY, K; BARTOLINI, S; WAGNER, E.D. Isolating antigenotoxic components and cancer cell growth suppressors from agricultural by-products. **Mutation Research**, v. 480-481, p. 109-120, 2001.

RABELLO-GAY, M.N; RODRIGUES, M.A.L.R; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de Avaliação.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira de Genética, 1991, 241p.

RASCHKE, M; ROWLAND, I.R; MAGEE, P.J; POO-ZOBEL, B.L. Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defence against oxidative stress. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 2322-2330, 2006.

REIFFERSCHIED, G. & HEIL, J. Validation of SOS/*umu* test using results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. **Mutation Research**, n. 369, p. 129-145, 1996.

RIBEIRO, L.R. & SALVADORI, D.M.F. Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. **Mutation Research**, v. 544, p. 195-201, 2003.

RIBEIRO, L.R. & MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ulbra, 2003, cap. 1, p. 21-26.

SAARINEN, N; JOSHI, S.C; AHOTUPA, M; LI, X; AMMALA, J; MAKELA, S; SANTTI, R. No evidence for the in vivo activity of aromatase – inhibiting flavonóides. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 78, p. 231-239, 2001.

SALVADORI, D.M.F; RIBEIRO, L.R; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L.R; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ulbra, 2003, cap. 8, p. 201-219.

SEBASTIAN, K.S. & THAMPAN, R.V. Differential effects of soybean and fenugreek extracts on the growth of MCF-7 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 170, p. 135-143, 2007.

SETCHELL, K.D; BROWN, N.M; ZIMMER-NECHEMIAS, L; BRASHEAR, W.T; WOLFE, B.E; KIRSCHNER, A.S; HEUBI, J.E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 447-453, 2002.

SNYDER, R.D. & GREEN, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 488, p. 151-169, 2001.

SPEIT, G; HANELT, S; HELBIG, R; SEIDEL, A; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology Letters**, v. 88, p. 91-98, 1996.

SPEIT, G; TRENZ, K; SCHÜTZ, P; ROTHFUB, A; MERK, O. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. **Toxicology Letters**, v. 110, p. 73-78, 1999.

SPEIT, G. & HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test), A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: HENDERSON, D. S. **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols - Eukaryotic Systems**. Totowa: Humana Press, v. 113, p. 203-211, 1999.

STOPPER, H; SCHMITT, E; KOBRAS, K. Genotoxicity of phytoestrogens. **Mutation Research**, v. 574, p. 139-155, 2005.

THOMSEN, A.R; ALMSTRUP, K; NIELSEN, J.E; SORENSEN, I.K; PETERSEN, O.W; LEFFERS, H; BREINHOLT, V.M. Estrogenic effect of soy isoflavonas on mammary gland morphogenesis and gene expression profile. **Toxicological Sciences**, v. 93, p. 357-368, 2006.

THYBAUD, V; AARDEMA, M; CLEMENTS, J; DEARFIELD, K; GALLOWAY, S; HAYASHI, M; JACOBSON-KRAM, D; KIRKLAND, D; MACGREGOR, J.T; MARZIN, D; OHYAMA, W; SCHULER, M; SUZUKI, H; ZEIGER, E. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing. **Mutation Research**, v. 627, p. 41-58, 2007.

TICE, R.R; AGURELL, E; ANDERSON, D; BURLINSON, B; HARTMANN, A; KOBAYASHI, H; MIYAMAE, Y; ROJAS, E; RYU, J.-C; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TWEATS, D.J; SCOTT, A.D; WESTMORELAND, C; CARMICHAEL, P.L. Determination of genetic toxicity and potential carcinogenicity *in vitro*- challenges post the Seventh Amendment to the European Cosmetics Directive. **Mutagenesis**, v. 22, p. 5-13, 2007.

UENG, Y.F; CHANG, Y.L; ODA, Y; PARK, S.S; LIAO, J.F; LIN, M.F; CHEN, C.F. In vitro and in vivo effects of naringin on cytochrome P450- dependent monooxygenase in mouse liver. **Life Sciences**, v. 65, p. 2591-2602, 1999.

ULUKAYA, E; OZDIKICIOGLU, F; ORAL, A.Y; DEMIRCI, M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 232-239, 2008.

VAINIO, H. Chemoprevention of cancer: a controversial and instructive story. **Med. Bull.**, v. 55, p. 500-593, 1999.

VALENTIN-SEVERIN, I; LE HEGARAT, L; LHUGUENOT, JC; LE BON, AM; CHAGNON, MC. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 536, p. 79-90, 2003.

VANHAUWAERT, A; VANPARYS, P; KIRSCH-VOLDERS, M. The *in vivo* micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. **Mutagenesis**, v. 16, n. 1, p. 39-50, 2001.

VAN MEEUWEN, J.A; TER BURG, W; PIERSMA, A.H; VAN DEN BERG, M; SANDERSON, J.T. Mixture effects of estrogenic compounds on proliferation and pS2 expression of MCF-7 human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2319-2330, 2007.

VILLELA, I.V; LAU, A; SILVEIRA, J; PRÁ, D; ROLLA, H.C; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J; ERDTMANN, B; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, cap. 7, p. 147-161.

ZEIGER, E. Illusion of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. **Mutation Research**, v. 543, p. 191-194, 2003.

ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? **Mutation Research**, v. 626, p. 1-3, 2007.

## **ANEXOS**

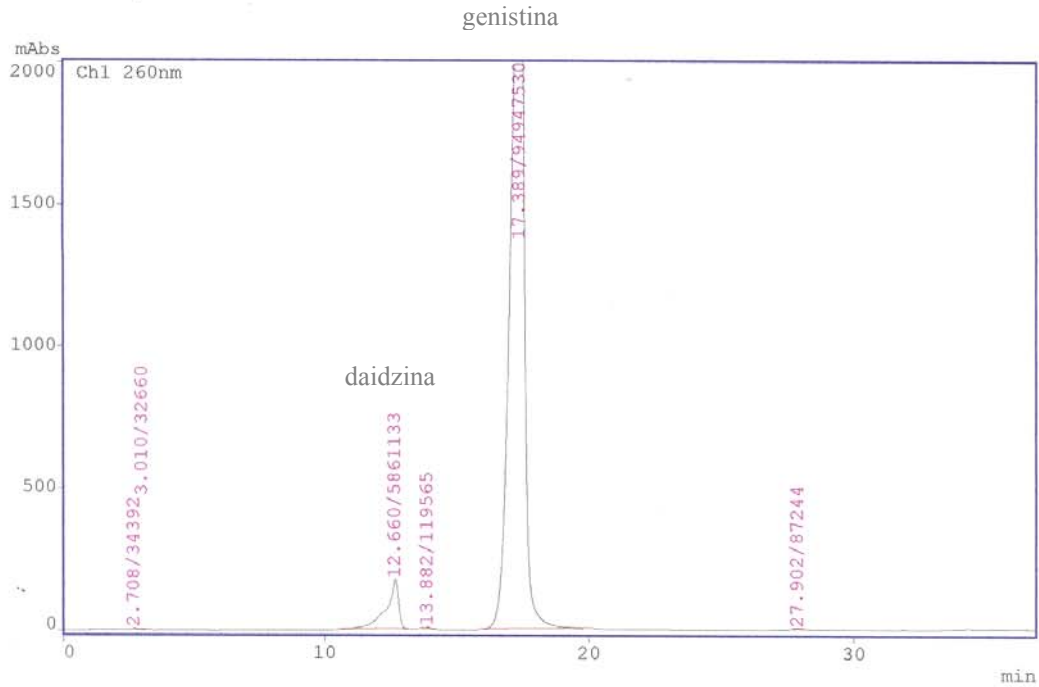
## **ANEXO 1**

**Doseamento por HPLC do fitoestrógeno obtido da EMBRAPA - Soja,  
Londrina – PR.**

## Anexo 1 – Doseamento por HPLC do fitoestrógeno obtido da EMBRAPA - Soja, Londrina – PR.

CLASS-M10A Ver.=1.64A SYS=1 REPORT.NO=2 DATA=AD11MGML.K01 06/11/20 15:05:27  
 Sample : AmDes1-1mg/ml  
 ID : AmDes1-1mg/ml  
 Type : Unknown  
 Detector : SPD-M10Avp  
 Operator : João Alves  
 Method Name : AD11MGML.M01

\*\*\* Chromatogram \*\*\*



\*\*\* Peak Report \*\*\*

TIME	AREA	NAME	PURITY.UP	PURITY.DOWN
2.708	34392			
3.010	32660			
12.660	5861133	daidzina		
13.882	119565			
17.389	94947530	genistina		
27.902	87244			

-----  
 101082524

## **ANEXO 2**

**Doseamento por HPLC do fitoestrógeno comprado em uma farmácia de  
manipulação local**

**Anexo 2 – Doseamento por HPLC do fitoestrógeno comprado em uma farmácia de manipulação local.**

Categoria Terapêutica: Fitoestrógeno  
Origem: China

ENSAIO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
Descrição	Pó fino marrom claro, odor característico	De acordo
Doseamento	Por HPLC : mínimo 40,0 % de isoflavonas em base seca	43,10 %
	Daidzina	8,93 %
	Glicitina	3,84 %
	Genistina	3,89 %
	Daidzeína	25,75 %
	Gliciteína	0,53 %
	Genisteína	0,16 %

Fonte: Laudo de análise do fornecedor.  
Ensaio realizado no Laboratório de Controle de Qualidade DEG.