



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE LICENCIATURA E BACHARELADO EM CIÊNCIAS**  
**BIOLÓGICAS**

**ALEXANDRE SARMENTO QUEIROGA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DO LEITE HUMANO NA**  
**INTERAÇÃO COM A ALFA CIPERMETRINA PELO TESTE DO**  
**MICRONÚCLEO EM CAMUNDONGOS**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2011**

**ALEXANDRE SARMENTO QUEIROGA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DO LEITE HUMANO NA  
INTERAÇÃO COM A ALFA CIPERMETRINA PELO TESTE DO  
MICRONÚCLEO EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Ciências Biológicas da  
Universidade Estadual da Paraíba, em  
cumprimento às exigências para  
obtenção do grau de Licenciado e  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Msc. José Cavalcanti da Silva

**CAMPINA GRANDE**

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

Q383a      Queiroga, Alexandre Sarmiento.

Avaliação do potencial antimutagênico do leite humano em interação com a Alfa Cipermetrina pelo Teste do Micronúcleo em camundongos [manuscrito] / Alexandre Sarmiento Queiroga. – 2011.

48 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2011.

“Orientação: Prof. Me. José Cavalcanti da Silva, Departamento de Biologia”.

1. Leite materno. 2. Contaminação alimentar. 3. Pesticida. I. Título.

21. ed. 649.33

**ALEXANDRE SARMENTO QUEIROGA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DO LEITE HUMANO NA  
INTERAÇÃO COM A ALFA CIPERMETRINA PELO TESTE DO  
MICRONÚCLEO EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Ciências Biológicas da  
Universidade Estadual da Paraíba, em  
cumprimento às exigências para  
obtenção do grau de Licenciado e  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 15/07/2011

  
\_\_\_\_\_  
Prof.º Msc. José Cavalcante da Silva/UEPB

Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Msc. Rômulo Herlon Vidal de Negreiros/Maurício de Nassau

Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Valéria Veras Ribeiro/UEPB

Examinador

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amigos Antonio Rafael de Medeiros Neto e Emmanuel Duarte Barbosa, que acreditaram em mim em um momento difícil da minha vida, ajudaram-me sem medir esforços. Dedico, sobretudo a Deus e à Santa Terezinha, minha protetora, enxerguei neles o fato de que a esperança move a trajetória humana.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a meu pai Roque Queiroga, minha mãe Terezinha Sarmiento, minha irmã Andrea e Amanda pelo apoio incondicional ao longo desses anos.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup>. Msc. José Cavalcanti da Silva e a Prof<sup>a</sup>. Dra. Valéria Veras Ribeiro e ao Prof<sup>o</sup> Msc. Rômulo Herlon Vidal de Negreiros que me ajudaram com suas orientações ao longo do curso e os demais professores que contribuíram para minha formação.

Aos todos os meus colegas de sala sem exceção, muito obrigado por conviverem comigo esses quatro anos.

Ao Funcionário Adalberto vulgo “Seu Beto” que foi muito atencioso comigo no almoxarifado da UEPB.

A Silvaney, diretor do Centro de Répteis da Caatinga pela concessão das cobaias.

Ao Prof. Dr José Etham Barbosa por ter concedido um espaço no Laboratório de Ecologia Aquática-LEAq

Ao anestesiólogo Dr. Antonio Carlos Vieira por ceder gentilmente as ampolas de Cloreto de Potássio.

Ao Médico Veterinário Dr. Milano Sales de Melo por ter colaborado com a eutanásia dos animais.

A empresa Cooperativa Agropecuária do Cariri Ltda pelo apoio financeiro

*“A vida é para quem topa qualquer parada. Não para quem pára em qualquer topada” Bob Marley*

## RESUMO

O leite humano é a primeira fonte de nutrição de um recém nascido, a amamentação fornece compostos bioativos como caseína, ácido linoléico conjugado, vitamina C e E, entre outras. Por outro lado, a literatura reporta que em vários países incluindo o Brasil foi detectada a contaminação do leite humano por resíduos de pesticida de várias classes químicas incluindo os Piretróides na qual a Cipermetrina faz parte. O inseticida Alfa Cipermetrina já foi muito estudado no que tange seus potenciais mutagênicos, carcinogênico e teratogênico tanto *in vivo* como *in vitro*. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar se o leite humano exerce atividade antimutagenica em interação com a cipermetrina. O Teste do Micronúcleo foi realizado usando sangue periférico de Camundongos Swiss albino com peso médio de 30 g, as lâminas foram coradas com Panótico Rápido sendo contados 2000 Eritrócitos Normocromáticos Circulantes por animal. Foram estabelecidos cinco grupos experimentais, sendo dois de exposição aguda e dois de exposição crônica e um grupo controle veículo, todos os animais foram tratados via gavagem; tratamento (I) 25 mg/kg de cipermetrina, tratamento (II) 25 mg/kg de cipermetrina acompanhada de leite humano meia hora depois, tratamento (III) 10 mg/kg de cipermetrina durante 5 dias, tratamento (IV) 10 mg/kg de cipermetrina durante 5 dias, acompanhado do leite humano meia hora depois, tratamento (V) água destilada. Para análise estatística foi realizado a ANOVA e o Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Constatou-se que houve atividade antimutagênica do leite humano tanto no grupo de exposição aguda quanto na exposição crônica.

**Palavras-Chaves:** Resíduos de pesticida, Leite humano, Quimioprevenção, Micronucleos, Swiss albin



## ABSTRACT

Human milk is the first nutritional source of the infants; Breastfeeding provide bioactive compounds like casein, conjugated linoleic acid, several vitamin and other. There are reports pesticide residues that have been found in milk of lactating mothers from several countries, mainly the chemical class of Pyrethroids, in which Cypermethrin is included. The insecticide alpha-cypermethrin has been widely studied about mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects both *in vivo* and *in vitro*. The aim of this study was to determine if human milk has antimutagenic activity against alpha-cypermethrin. The Micronucleus Test was carried out by peripheral blood of Swiss albino mice with average weight of 30 g. The slides were stained with Panotic and were counted 2000 Normochromatic Circulating Erythrocyte per animal. Five experimental groups with six animals orally treated during five days were established; treatment (I) 25 mg/kg cypermethrin; treatment (II) 25 mg/kg cypermethrin followed by human milk thirty minutes later, treatment (III) 10 mg/kg cypermethrin during five days; treatment (IV) 10 mg/kg cypermethrin during five days, followed by human milk thirty minutes later; treatment (V) distilled water. For data analysis were used ANOVA and Tukey Test ( $\alpha=0,05$ ). It was observed that human milk exerted antimutagenic effect in acute exposure and, simultaneously in chronic exposure human milk still exerted this latter.

**Keywords:** Pesticide Residues, Human Milk, Chemoprevention, Micronucleus, Swiss albino

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>FIGURA 1</b> – Formação do micronúcleo por clastogênese	20
<b>FIGURA 2</b> – Formação do micronúcleo por aneugênese	20
<b>FIGURA 3</b> – Leite humano cedido pelo Instituto Elpídio de Almeida – ISEA	23
<b>FIGURA 4</b> - Aplicação via oral com a agulha de gavagem	25
<b>FIGURA 5</b> – Agulha de gavagem	25
<b>FIGURA 6</b> - Lâminas não corada e corada com Panótico Rápido	25
<b>FIGURA 7</b> - Kit de coloração Panótico Rápido	26
<b>FIGURA 8</b> - Eritrócito Normocromático Circulante Micronucleado	26
<b>FIGURA 9</b> - Valores Médios dos Eritrócitos Normocromáticos Circulantes Micronucleados em função do tratamento	29

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** – Resumo da análise de variância referente a comparação de média entre os tratamentos e blocos

28

## LISTA DE ABREVIações

**AVMA** American Veterinary Medicine Association

**DL<sub>50</sub>** Dose Letal Mediana

**EDTA** Ácido Etilenodiamino Tetra Acético

**ISEA** Instituto de Saúde Elpídio e Almeida

**LHOc** Leite Humano Cru ordenhado

**GL** Grau de Liberdade

**SQ** Soma dos Quadrados

**QM** Quadrado Médio

**F** Teste F

**p** Valor P

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	16
2.1 Cipermetrina	16
2.2 Leite Humano	17
2.3 Quimioprevenção	19
2.4 Teste do Micronúcleo	21
<b>3 OBJETIVOS</b>	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	24
4.1 Aspectos Éticos	24
4.2 Local de Trabalho	24
4.3 Delineamento Experimental	25
4.4 Aplicação do Teste de Micronúcleos	25
4.5 Eutanásia	28
4.6 Análise Estatística	28
<b>5 RESULTADOS</b>	29
<b>6 DISCUSSÕES</b>	31
<b>7 CONCLUSÃO</b>	35
<b>8 BIBLIOGRAFIA</b>	36
<b>ANEXOS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, são muitos os agentes mutagênicos presentes no meio ambiente, causando na comunidade científica crescente preocupação com estudos de mutágenos bem como métodos de detecção de mutagênese. Inversamente, há grande interesse na pesquisa por agentes antimutagênicos, que uma vez detectados tornam-se alvos de atenção de especialistas como algo capaz de proporcionar prevenção de efeitos indesejáveis ou controle da iniciação e progressão tumoral.

O DNA reage facilmente com uma variedade de compostos químicos e alguns agentes físicos, a maioria presente no meio ambiente. Alguns desses são produtos do metabolismo ou decomposição de nutrientes da alimentação. Outros, precisamente nas décadas recentes são frutos da industrialização e contribuem vertiginosamente para alterações no DNA desaguando em consequências hereditárias ou fisiológicas. Essas mudanças na estrutura molecular são chamadas de *DNA damage* (danos ao DNA), pode ser espontânea e ambiental (FRIEDBERG *et al.*, 1995).

Os agentes mutagênicos alteram a sequência das bases no DNA podendo acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, determinando assim o aparecimento do câncer (RIBEIRO *et al.*, 2003).

A observação de muitas substâncias, algumas delas pertencentes aos constituintes da dieta natural, podem diminuir tumorigênese em animais e pelas implicações epidemiológicas em humanos, tem levado a idéia de que o consumo delas poderia prevenir o câncer e até mesmo desacelerar sua progressão. Inúmeras substâncias têm sido testadas em animais de laboratório e inúmeros testes clínicos foram, estão e serão realizados em todo mundo (RUDDON, 2010).

Algumas dessas substâncias como exemplo, a selenio-metionina que exerce efeito antimutagênico em interação com o quimioterápico Doxorubicina em linfócitos humanos (SANTOS; TAKAHASHI, 2008), leite de camelo diminui

a indução de micronúcleos e aberrações cromossômicas causada pela Cisplatina em medula óssea de ratos (SALWA; LINA, 2010), vitamina C e extrato aquoso de alho diminuem a indução de micronúcleo e aberrações cromossômicas pela Cipermetrina em medula óssea de ratos (ASSAYED *et al.*, 2010), extrato metanólico da casca do caju diminui aberrações cromossômicas em células V79 de Hamster Chinês (BARCELLOS *et al.*, 2007), proantocianidinas de sementes de *Vitis vinifera* L. protege células somáticas de *Drosophila melanogaster* contra Doxorubicina (REZENDE *et al.*, 2009).

Devido à importância do leite humano na nutrição de um recém nascido e pesquisas que mostram a capacidade do leite humano em destruir células cancerígenas e também pelo fato de o leite humano conter proteínas com atividades antimutagênicas tanto *in vivo* como *in vitro*, segundo pesquisas já realizadas. Por outro lado, também foi detectada a presença de inúmeras classes químicas de agrotóxico no leite de lactantes em vários países, dentre elas estão os Piretróides na qual a Cipermetrina faz parte.

O objetivo deste estudo é avaliar se o leite humano diminui a indução de micronúcleos pela Alfa Cipermetrina em sangue periférico de camundongos. O presente trabalho é inédito, a literatura não reporta estudos sobre a relação do leite humano e quimioprevenção contra agrotóxicos, justificando o interesse em estudar a possível propriedade antimutagênica do leite humano *in vivo* em interação com a alfa cipermetrina.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cipermetrina

Alfa – ciano – 3 - fenoxibenzil – 3- 2,2 – diclorovinil - 2,2 - dimetil ciclopropano carboxilato (Cipermetrina), é o piretróide do Tipo II mais usado, um inseticida biodegradável de largo espectro, funciona também como uma neurotoxina de ação rápida, absorvida diretamente no estômago, ataca abelhas, pragas do algodão, das frutas e de várias culturas vegetais. De natureza lipofílica a cipermetrina já foi encontrada em vários tecido do corpo de indivíduos contaminados tais como adipócitos, pele, fígado, rins, glândulas adrenais, ovários e cérebro (TIAN *et al.*, 2008).

No Brasil cipermetrina deve ser usada nas culturas do Algodão, Café, Fumo, Milho, Soja e Tomate, atacam algumas pragas como o bicudo (*Anthonomus grandis*), largata-rosa (*Agrotis ipsilon*) e o bicho meineiro do café (*Leucoptera coffeella*) (AGROFIT).

A cipermetrina pertence a classe química dos Piretróides, estes são derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas. (SPENCER *et al.*, 2001; NASUTI *et al.*, 2003) As piretrinas foram utilizadas como inseticidas durante muitos anos, devido a sua ação sob uma vasta variedade de insetos e à baixa toxicidade em mamíferos, quando em circunstâncias de uso adequado. Entretanto, as piretrinas naturais apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, o que diminui a sua eficácia no controle de pragas da agricultura e de outros insetos (SANTOS *et al.*, 2007).

O uso dos piretróides sintéticos na agricultura iniciou-se na década de 70 após mudança estrutural introduzida nas piretrinas, para modificar a estrutura química com o intuito de se obter substâncias com maior estabilidade e potencial inseticida. Assim, a inclusão de átomos de nitrogênio, enxofre e átomos de halogênios às piretrinas solucionou os problemas de estabilidade relacionados às substâncias naturais, enquanto manteve relativamente baixa a toxicidade aguda em mamíferos (HEUDORF; ANGERER, 2001).



Dentre os piretróides que circulam no mercado, destacam a Ciflutrina, Beta Ciflutrina, cipermetrina, Deltametrina e Permetrina, há vários estudos focando o potencial mutagênico dessas substâncias. Bhunya e Pati (1988) observaram que a cipermetrina induzia aberrações cromossômicas e ao mesmo tempo micronúcleos em medula óssea de rato. Surrallés *et al* (1995) estudaram 5 inseticidas piretróides, cipermetrina, deltametrina, fenpropatina, fenvalerato e a permetrina, testaram a capacidade em induzir micronúcleos em culturas de sangue periférico e leucócitos humano usando o método de bloqueio de citocinese com 6 µg/ml de citocalasina B, concluíram que CPM, deltametrina e fenpropatina possuem fraca atividade genotóxica *in vitro* e fenvalerato e permetrina não possuem atividades mutagênicas na mesma situação supracitada. Os estudos de Patel *et al* (2006) com o Teste do Cometa mostram que a cipermetrina causou danos ao DNA em vários órgãos e a ordem por grau de danos do maior para o menor foi cérebro, baço, rim, medula óssea e fígado.

Por outro lado existem estudos mostrando a ausência de mutagenicidade da CPM em linfócitos de sangue periférico humano (PUIG *et al.*, 1989), nas células testiculares de ratos (EL-ASMAWY *et al.*, 1993) e por micronúcleos e aberrações cromossômicas em medula óssea de ratos (INSTITÓRIS *et al* 1999).

## 2.2 Leite Humano

O leite humano contém anticorpos contra bactérias e vírus, incluindo concentrações relativamente altas de IgA secretora, que impedem a aderência de microorganismo à mucosa intestinal (VAN DE PERRE, 2003; CONWAY *et al.*, 2003). Os macrófagos normalmente presentes no colostro e leite humanos são capazes de sintetizar complementos, lisozima e lactoferrina. A lactoferrina é membro da família da transferrina, esta glicoproteína transfere íons Fe (3+), sendo a única proteína polifuncional que influencia a proliferação e diferenciação celular. Ela é capaz de regular a granulopoiese e a síntese de DNA em algumas células e pode interagir com DNA, RNA e polissacarídeos (KANYSHKOVA *et al.*, 2001).

O colostro do leite humano é um do mais potente antioxidante e imuno estimulador conhecido nas pesquisas em nutrição. É uma fonte de componentes antioxidantes, nutrientes e contém mais proteínas, imunoglobulinas, proteínas não nitrogenadas, lipídios e minerais que o leite comum. Estudos indicam que o colostro é carregado com leucócitos polimorfonuclear e macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, células do plasma e células epiteliais (KASAPOVIC *et al.*, 2005).

Nas fases de transição e maduro o leite humano é uma fonte rica em nutrientes e contém moléculas biologicamente ativas que são essenciais para funções antioxidantes específicas (BUESCHER *et al.*, 1989; ALBERTI-FIDANZA *et al.*, 2002). Ele possui o potencial para ajudar a reconstituir o sistema imunológico, reforçando simultaneamente o crescimento celular e reparação tecidual. Colostro e leite humano maduro são excelentes suplementos nutricionais, um alimento que protege e promove o desenvolvimento, diferenciação e crescimento (ALBERTI-FIDANZA *et al.*, 2002)

Alfa lacto albumina humana letal para células tumorais (HAMLET) é um complexo lipoprotéico capaz de matar células tumorais (HAKANSSON *et al.*, 1995; SVENSSON *et al.*, 2000) e mostra atividade promissora *in vivo* (FISHER *et al.*, 2004; MOSSBERG *et al.*, 2007). Infusão intra cranial de HAMLET prolongou a sobrevivência de ratos que continham xenoenxertos de glioblastoma humano (FISHER *et al.*, 2004) e inoculações intra vesicular de HAMLET em pacientes de câncer de bexiga causou rápido desaparecimento de células tumorais e redução do tamanho do tumor (MOSSBERG *et al.*, 2007). Aplicação tópica de HAMLET removeu papilomas dermais em um grupo placebo de estudos clínicos (GUSTAFSSON *et al.*, 2004).

O leite humano contém substâncias comuns ao leite bovino e ao leite de camelo, a vitamina C, por exemplo, já foi testada *in vivo* e *in vitro* quanto aos potenciais antimutagênico e anticlastogênico contra a mitomicina C (KRISHNA *et al.*, 1986), bleomicina (PORVIK; AUSTIN, 1991; ANDERSON *et al.*, 1995) radiação (CASTILLO *et al.*, 2000) e rifampicina (ALY; DONYA, 2002). O potencial antimutagênico da caseína foi investigado por Van Boeckel *et al.* (1993) apud Salwa e Lina (2010) usando vários mutágenos dos quais

benzopireno e *N*-metil nitrosourea, segundo o mesmo autor a hidrólise da pepsina aumenta o potencial antimutagênico da caseína. Salwa e Lina (2010) verificaram que o leite de camelo exercia atividade antimutagênica contra a cisplatina pelo teste do micronúcleo em ratos e uma melhoria no índice mitótico das células da medula óssea dos mesmos animais.

Existem trabalhos que reportam a contaminação do leite humano por resíduos de agrotóxicos, Waliszewski *et al* (2001) reportaram análise feita em mulheres no México e aferiu que pesticidas Organoclorados circulavam no soro sanguíneo, leite humano na fase colostro e maduro e tecido adiposo, pode também transpor a barreira placentária, Skaare e Polder (1990), estudaram a presença de bifenóis Policlorados e pesticidas organoclorados em mulheres lactantes da Noruega, Hopper *et al* (1997) encontraram pesticidas organoclorados no leite de mulheres do sudoeste do Cazaquistão, Schinas *et al* (2000) reportaram algo semelhante na Grécia, Bouwman *et al* (2006) encontraram organoclorados e piretróides em Kwazulu-natal cidade da África do Sul, ainda de acordo com o último autor o Limite Residual Máximo permitido pela World Health Organization (WHO) é de 50 µg/l wm e Jozini na Africa do Sul os resíduos de cipermetrina no leite das mulheres ultrapassou o limite residual máximo.

### **2.3 Quimioprevenção**

A quimioprevenção no sentido literal da palavra seria a prevenção do câncer com drogas, neste contexto droga teria seu conceito ampliado para suplementos da dieta como, vitaminas, sais minerais, ácidos graxos essenciais. Segundo Brenner (2005), quimioprevenção pode ser definida como “*o uso da intervenção como fármacos, vitaminas, minerais ou outras substâncias que reduzem a incidência de câncer*”. Os agentes quimiopreventivos podem ser classificados como antimutagênicos, agentes bloqueadores de carcinógenos, antiproliferativos e antioxidantes, mas há uma sobreposição entre os agentes dessas categorias, pois devem ter mais de um mecanismo de ação.

Uma substância antioxidante pode ser definida como uma substância química que inibe o processo de oxidação, ou, quando presente em baixa

concentração comparada a do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato (OLGA *et al.*,2008) Os compostos antioxidantes do ponto de vista biológico protegem os sistemas vivos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares.

Há um sistema de defesa antioxidante que atua em diferentes níveis; a primeira linha de defesa é formada por substâncias que impedem a formação de espécies reativas de oxigênio, ou sequestram-nas de maneira a impedir sua interação com alvos celulares, isto é, bloqueia a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Neste nível atuam enzimas antioxidantes, quelantes e proteínas, como a transferrina, ceruplasmina, catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e, por fim substâncias não enzimáticas como o urato, ascorbato, albumina, bilirrubina e carotenóides. A segunda linha é formada por compostos fenólicos ou aromáticos que bloqueiam a propagação da cadeia radicalar, tocoferóis, tocotrienóis, flavanóides, entre outros, e finalmente os sistemas de reparo de DNA removem as lesões oxidativas (RIBEIRO *et al.*, 2003; DUFFUS; WORTH, 2006).

Antiproliferativos são substâncias que inibem a divisão celular, interferindo nas proteínas do ciclo celular, induzindo a apoptose, alquilando regiões de transcrição no DNA e alteração na polimerização dos microtúbulos. Alguns exemplos dessas substâncias são retinóides e carotenóides, antihormônios como finasterida e tamoxifeno, anti-inflamatórios como aspirina, curcumina, ibuprofeno (RUDDON, 2010), ecteinaiscidina 743 (GAJATE, 2002; KUREK, 2005) extrato de *Litopenaeus vannamei* (WILSON-SANCHEZ *et al.*, 2010), extratos de plantas medicinais como *Ononis hirta*, *Inula viscosa*, *Salvia pinardi*, *Verbascum sinaiticum* e *Ononis sicula* (TALIB; MAHANESH, 2010) entre outras.

Goeptar *et al.*, (1997) sugerem que a estrutura molecular de uma proteína determina o efeito quimioprotetor contra mutágeno. Segundo o mesmo autor a quimioproteção parece ter correspondência como a ausência de estrutura terciária e secundária. Estes achados abriram janelas para investigar a prevenção de mutagêneses e ou carcinogêneses pelos compostos presente nos alimentos.

## 2.4 Teste do Micronúcleo

O Teste do Micronúcleo é o bioensaio *in vivo* mais usado para avaliação de agentes clastogênicos conhecidos por quebrarem cromossomos, figura 1, e de agentes aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal, figura 2, este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongo, mas também é realizado em ratos.

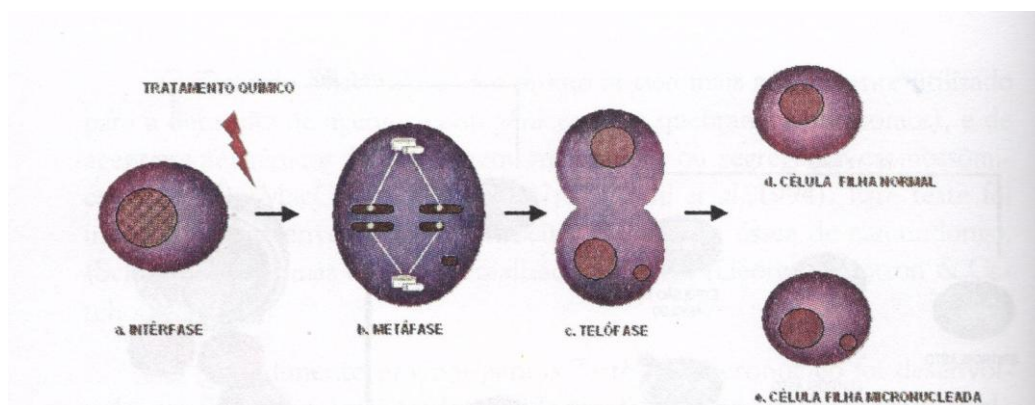


Figura1. Formação do micronúcleo por clastogênese (RIBEIRO *et al.*, 2003).

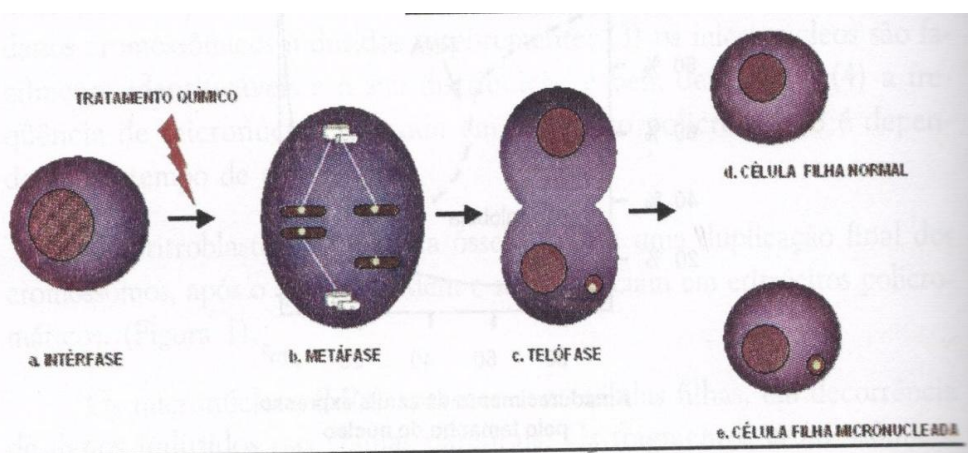


Figura 2. Formação do micronúcleo por aneugênese (RIBEIRO *et al.*, 2003)

O procedimento original foi desenvolvido por Schmid e colaboradores em 1971 e, subseqüentemente, modificado por Heddle (1983). Os micronúcleos aparecem nas células filhas, em decorrências de danos induzidos nos Eritroblastos, então fragmentos cromossômicos resultantes de quebras são incorporados no núcleo das células filhas após a mitose, assim uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento cromossômico o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal e durante a

diferenciação o núcleo principal é expelido enquanto que o micronúcleo fica retido (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Os micronúcleos são analisados em Eritrócitos Policromáticos de medula óssea de camundongos ou ratos. Alternativamente, em camundongos, os micronúcleos podem ser analisados em Eritrócitos Normocromáticos Circulantes, uma vez que o baço dos camundongos não remove eritrócitos contendo micronúcleos.

O teste do micronúcleo é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos agentes químicos e farmacêuticos que entram no mercado mundial e, com a mesma confiabilidade é utilizada para avaliar compostos mutagênicos, o teste de micronúcleo tem sido empregado para avaliar o potencial antimutagênico de vários compostos (CHOY, 2001 apud RIBEIRO *et al.*, 2003).

De acordo com Surrallés e Natarajan (1997), as principais vantagens da análise de células micronucleadas são a velocidade e a facilidade com que este tipo de estudo pode ser efetuado, especialmente quando são aplicados em roedores em estudos *in vivo*, além de permitir a inferência de processos de aneugênese e clastogênese.

As principais vantagens da utilização do sangue periférico para a análise de micronúcleos são; um mesmo animal pode fornecer várias amostras de material, a simplicidade da preparação das amostras e a abundância e uniformidade da população. Com a mesma confiabilidade que é utilizada para avaliar compostos mutagênicos, o teste de micronúcleo tem sido empregado para avaliar o potencial antimutagênico de vários compostos.

### 3 OBJETIVOS

- Detectar possível atividade antimutagênica do leite humano em interação com a alfa cipermetrina *in vivo*.
- Verificar se o leite humano diminui a indução de micronúcleos pela alfa cipermetrina (50% DL<sub>50</sub>) em camundongos sob exposição aguda.
- Verificar se o leite humano diminui a indução de micronúcleos pela alfa cipermetrina (20% DL<sub>50</sub>) em camundongos sob exposição crônica.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos Éticos

O presente Estudo foi avaliado pela Comissão de Ética em Uso Animal–CEUA/FCM Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) e aprovado nº **005/220611**, anexo 1, e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual da Paraíba – CEP/UEPB e aprovado **CAAE 0161.0.133.000-11**, anexo 2.

### 4.2 Local do Trabalho

O trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Aquática-LEAq, os animais foram cedidos gentilmente pelo Centro de Répteis da Caatinga e foram mantidos em caixas de polipropileno, com tampa-grade, durante o período de tratamento, com água e alimento *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de  $23 \pm 2$  °C.

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino) com média de 30g de peso corpóreo, os animais foram divididos em 5 grupos de 6, sendo 3 machos e 3 fêmeas. O leite humano de fase maduro, figura 8, foi cedido no Instituto de Saúde Elpídio de Almeida – ISEA na cidade de Campina Grande –PB, anexo 3.

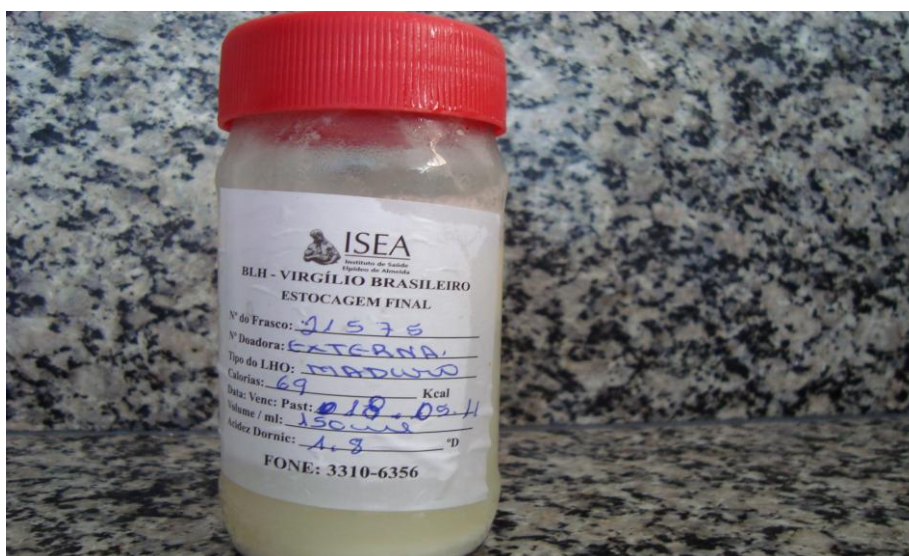


Figura 3. Leite humano cedido pelo Instituto de Saúde Elpídio de Almeida – ISEA. Arquivo pessoal, 2011.



### 4.3 Delineamento Experimental

A montagem do experimento foi conduzida baseando-se nos trabalhos de Assayed *et al.*, (2010) e Sankar *et al.*, (2010), o delineamento foi do tipo bloco casualizado. As doses dadas aos animais foram baseada nos trabalhos de Luty *et al.*, (2000), na qual foram usados 25 mg/kg (1/2 DL<sub>50</sub>) e 10 mg/kg (1/5 DL<sub>50</sub>), cada camundongo recebeu o leite humano e a Alfa cipermetrina *via gavagem*, num volume máximo de 0,1 mL para cada 10g de peso corpóreo.

**Tratamento 1:** administração de 50% da DL<sub>50</sub> da alfa cipermetrina.

**Tratamento 2:** administração de 50% da DL<sub>50</sub> da alfa cipermetrina seguido do leite humano após meia hora.

**Tratamento 3:** administração de 20% da DL<sub>50</sub> da alfa cipermetrina, durante cinco dias.

**Tratamento 4:** administração 20% DL<sub>50</sub> da alfa cipermetrina seguido do leite humano após meia hora, durante cinco dias.

**Tratamento 5:** administração de água destilada como controle veículo.

### 4.4 Aplicação do Teste do Micronúcleo

Trinta horas após a aplicação via oral, figura 4, com agulha de gavagem, figura 5, em cada grupo experimental, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica a parte terminal da cauda dos animais foi cortada, coletou-se 5 µL de sangue através do tubo capilar, ao qual fora, anteriormente, adicionado Ácido Etilenodiamino Tetra Acético-EDTA e, logo em seguida, foram realizado os esfregaços sanguíneos nas lâminas de borda fosca, após 24h as lâminas, figura 6, foram coradas com Panótico Rápido, figura 7.



Figura 4. Aplicação via oral com a agulha de gavagem. Arquivo Pessoal, 2011.



Figura 5. Agulha de gavagem. Arquivo pessoal, 2011.

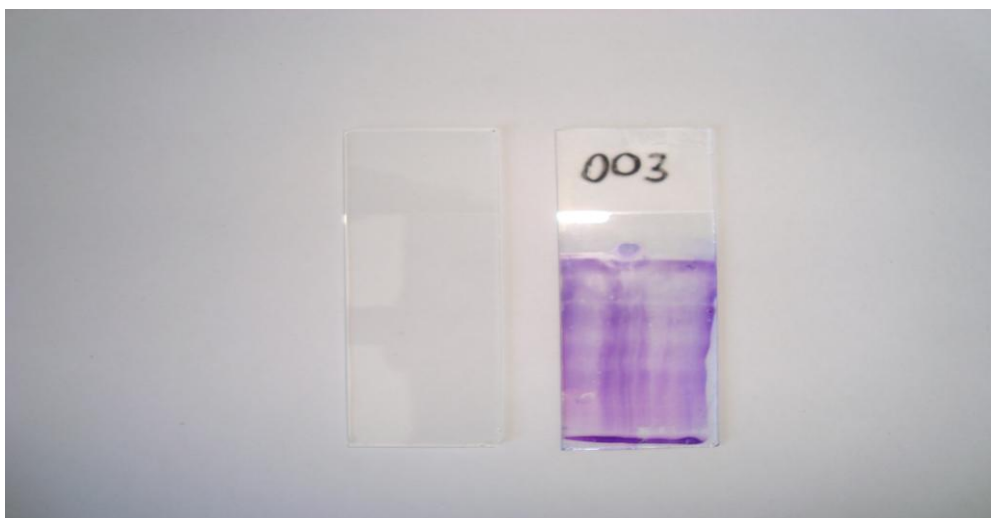


Figura 6. Lâminas não corada e corada com Panótico Rápido. Arquivo Pessoal, 2001.

Posteriormente as lâminas foram secas durante 25 minutos em temperatura ambiente e, por fim foram analisadas com auxílio de um microscópio óptico (OLYMPUS CX21) em lentes objetivas de 100x. Foram contados 2000 Eritrócitos Normocromáticos Circulantes por animal e anotadas as médias de Eritrócitos Normocromáticos Circulantes Micronucleado, figura 8.



Figura 7. Kit de coloração Panótico Rápido. Arquivo pessoal, 2011.



Figura 8. Eritrócito Normocromático Circulante Micronucleado. Arquivo Pessoal, 2011.

#### **4.5 Eutanásia**

A eutanásia foi realizada logo após os animais receberem os tratamentos, em cada grupo, descrito abaixo, com o auxílio de um médico veterinário cadastrado no CRM conforme a declaração de colaboração, anexo 4. Foram seguidas as diretrizes da American Veterinary Medicine Association (AVMA) do ano de 2007 na qual foram aplicada de acordo com o peso corpóreo individual Cetamina associada a Xilazina (0,1ml/10g cada uma), via intraperitoneal, a fim de causar a perda rápida da consciência e, logo após, uma solução supersaturada de Cloreto de Potássio para obter a parada cardiorrespiratória via intracardiaca.

#### **4.6 Análise Estatística**

Após a análise citológica das lâminas foram anotadas as médias de Eritrócitos Normocromáticos Circulantes Micronucleados e, em seguida foi realizado a Análise de Variância de Bloco Casualizado e o Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

O resultado do teste de micronúcleos visto sob Análise de Variância ( $\alpha=0,05$ ) mostra que há diferença entre as médias dos tratamentos, tabela 1.

Tabela 1. Resumo da análise de variância referente à comparação de média entre os tratamentos e blocos

	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Tratamentos</b>	4	135,54	33,88	32,26**	0,000
<b>Bloco</b>	5	38,71	7,74		
<b>Resíduos</b>	20	21	1,05		
<b>Total</b>	29	195,25			

1. \*\*Significativo a 5% de probabilidade.

No grupo de exposição aguda T1 e T2, figura 9, a alfa cipermetrina induziu significativamente a formação de micronúcleos em relação ao grupo veículo controle T5 e, o leite humano diminuiu a indução de micronúcleos pela alfa cipermetrina, apresentando atividade antimutagênica,

No grupo de exposição crônica T3 e T4, figura 9, a alfa cipermetrina induziu a formação de micronúcleos em relação ao veículo controle T5 e, o leite humano diminuiu a indução de micronúcleos pela alfa cipermetrina discretamente, no entanto o Teste de Tukey mostra-se significativo, figura 9.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos onde a alfa cipermetrina foi aplicada sem o leite humano, T1 e T3, figura 9, tornando mais evidente a atividade mutagênica da alfa cipermetrina. A diferença estatística entre os grupos T2 e T4, figura 9, na qual o leite humano fora aplicado após a alfa cipermetrina, deve se ao tempo de exposição já mencionado.

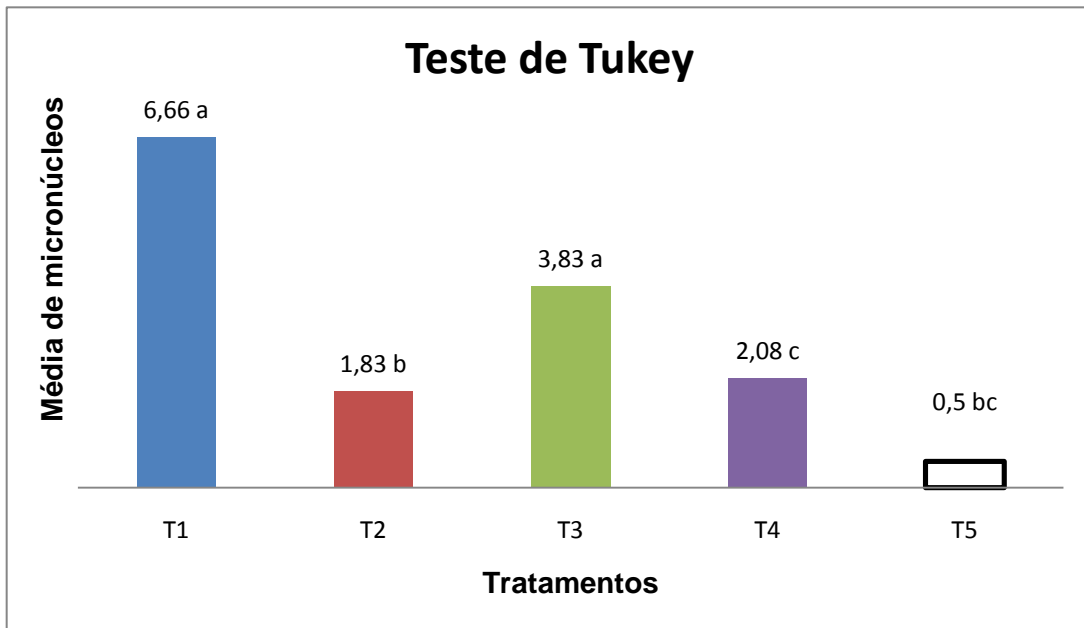


Figura 9. Valores Médios dos Eritrócitos Normocromáticos Circulantes Micronucleados em função do tratamento.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo os efeitos quimiopreventivo do leite humano na mutagenicidade induzida pela alfa cipermetrina foi avaliada pelo teste de micronúcleos, essencialmente este ensaio detecta danos persistentes pelo menos em ciclo mitótico. Os dados deste estudo e de alguns semelhantes já citados indicam claramente que a alfa cipermetrina interage e causa interações com o DNA celular de mamíferos in vivo, como já fora mencionado há uma correlação consistente de mutagenicidade e carcinogenicidade entre os vários piretróides validando a presente investigação citogenética.

Os resultados mostram que a exposição crônica de alfa cipermetrina parece ter baixa toxicidade em relação à exposição aguda, estes resultados poderiam ser explicados pelo fato que a cipermetrina, como um piretróide sintético, não ter tendência a se acumular no corpo do animal (SANTOS et al., 2007). Portanto  $\frac{1}{2}$  DL<sub>50</sub> foi mais efetiva na geração de micronúcleos, a figura 4 mostra-nos uma diferença significativa entre as médias.

Talvez esta dose tenha enfraquecido a capacidade dos mecanismos de reparo no intervalo de 30h. Enquanto isto, a exposição crônica de  $\frac{1}{5}$  DL<sub>50</sub> não causou uma quantidade considerável de micronúcleos, tal redução na mutagenicidade supõe-se ser devido aos mecanismos de reparo das células trabalharem de maneira mais favorável e eficiente. Adicionalmente no caso de doses repetidas o intervalo de 30 h é longo suficiente para muitas das células danificadas sofrerem apoptose (ASSAYED et al., 2010).

Rabello-Gay et al. (1991) consideram normal uma frequência de três Eritrócitos Policromáticos Micronucleados a cada 1000 em ratos. Witt (2008) comparou teste de micronúcleo com corante Acridine Orange em microscopia de fluorescência e fluxo de citometria para verificar a acurácia de ambos na detecção de reticulócitos micronucleados (eritrócitos imaturos) em medula óssea e sangue periférico de ratos Fisher 344 e camundongos B6C3F1 e observou que não há diferença significativa na mensuração de reticulócitos micronucleados entre ambos.

Segundo Kishi *et al.*, (1992), em estudos comparativos entre a técnica convencional de coloração por Giemsa de células da medula óssea de camundongos e a técnica de coloração por Acridine Orange não houve divergência nos resultados, sendo que, a última técnica utilizada mostrou-se tão sensível quanto a primeira. A coloração das lâminas no presente trabalho foi realizada usando Panótico Rápido, corante hematológico de pH neutro como o Giemsa, permitindo a interação com componentes nucleares.

Como já fora mencionado, não há estudo sobre a relação agrotóxico e leite humano na perspectiva aqui apresentada, mas há um paralelo entre os resultados deste estudo com outros que revelam substância que apresentam atividade quimioprotetora contra cipermetrina. Sankar *et al.*, (2010) descobriram que a Curcumina protegia contra a indução de micronúcleos em ratos pela cipermetrina e no Teste do Cometa (Comet Assay) também houve atividade quimioprotetora, Assayed *et al.*, (2010) verificaram que tanto no teste do micronúcleo quanto nos ensaios das aberrações cromossômicas que o alho e a vitamina C exerciam atividades antimutagênica tanto isolados quanto associados, sendo que o alho mostrou-se mais eficaz que a vitamina C, o leite de camelo diminui a indução de micronúcleos e aberrações cromossômicas causada pela Cisplatina em medula óssea de ratos (SALWA; LINA, 2010)

Existem estudos que podem explicar a atividade antimutagênica do leite humano apresentada no presente estudos. Vitamina C e E, retinal e beta caroteno, lactoferrina e glutathione, catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, são conhecidas por desempenharem papel específico na peroxidação dos lipídios e, adicionalmente há evidências que o leite humano já exerce atividade antioxidante desde nos primeiros dias de nascimento através da mensuração dos níveis de 8-hidroxidoxiguanosina quando o recém nascido apresenta baixo peso (SHOJI *et al.*, 2004; KASAPOVIC *et al.*, 2005).

O potencial antimutagênico da caseína foi investigado por Van Boekel *et al.* (1993) apud Salwa e Kudi (2010) usando vários mutágenos. Eles descobriram que pré incubação aumenta o potencial antimutagênico da caseína em interação com a N-nitroquinolina\_1\_óxido (NQO) e adicionalmente o potencial antimutagênico da caseína aumenta com a hidrólise da pepsina, Goepfar *et al.*, (1997) descobriram que a caseína do leite exercia



efeito antimutagênico contra o N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG) em camundongos BALB/c. Bosselaers *et al.* (1994) reporta que a pepsina hidrolisada inibia a indução de Troca de Cromátides Irmãs por NQQ e MNNG concluindo que a caseína e os produtos oriundo da hidrolise da pepsina protegem células de mamíferos contra certos compostos genotóxicos e levantando a hipótese de que as proteínas agem como um agente bloqueador pela interação química ou física com os mutágenos.

Ácido Linoléico Conjugado (ALC) foi identificado como um componente do leite e produtos alimentícios há muito tempo, é formado como um intermediário no curso da conversão de ácido linoléico em ácido oléico no sistema digestório. ALC serve como um importante antioxidante presente nos alimentos fornecendo valores adicionais do seu potencial bioativo na prevenção de doenças (BARD EL-DIN; OMAYE, 2007). Liew *et al.* (1995) sustentam que o ALC está envolvido em um mecanismo de inibição de carcinógenos e não na interação direta com pró carcinógenos, nem seqüestrando eletrófilos ou mesmo na indução seletiva da Fase I na destoxificação.

A Acidez Dornic do Leite Humano ordenhado cru (LHOc) doado pelo ISEA foi de 1,8 °D, isto diz respeito a acidez do leite provocado por ácido láctico ou até mesmo ácido cítrico, diferenciando da acidez aparente que é mensurada pelo potencial hidrogeniano (pH). Sendo a concentração de ácido láctico invariável à baixa temperatura, a acidez Dornic poderá ser diretamente influenciada pela concentração de ácidos graxos não esterificados de cadeia longa, por exemplo, ácido linoléico (HAMOSH *et al.*, 1996; MORERA-PONS *et al.*, 1995).

Segundo Cavalcante *et al.*, (2005) o leite humano ordenhado cru, se não utilizado de imediato, deve ser armazenado a 4°C por até 12 horas ou a -10 a -18°C por no máximo 15 dias. A amostra de leite humano cedida pelo o ISEA para realização do experimento tinha um valor calórico de 69 kcal, 1,8 °D e foi estocado em geladeira comum, como tais eletrodomésticos possuem apenas termostato, seria impossível afirmar que o frasco com LHOc permaneceu com as temperaturas recomendadas (4°C/24 horas ou 10°C a 18°C/15 dias).

Considera-se que quanto maior a concentração de lipídios menor é o pH do LHOc e maior é a acidez titulável, porém Cavalcante *et al.*, (2005)

verificaram que essa tendência não é confiável, usando o teste de acidez titulável e observando teores de creme, gordura total e valor energético. Os autores supracitados chegaram a conclusão de que °D acima de 7 não é recomendado para neonatos, pois há redução no teor energético e gorduras totais, indicando que a acidez dornic mensurada no LHOc usado nos experimentos pode explicar os resultados obtidos associados a baixa capacidade e bioacumulação da alfa cipermetrina exceto em tecido adiposo como já fora relatado.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, observou-se que o leite humano diminuiu a indução de micronúcleos pela alfa cipermetrina em camundongos sob exposição aguda (50% DL50) e crônica (20% DL50) concomitantemente, portanto, o referido leite usado neste trabalho nas condições de 69 kcal, 1,8 °D e fase Maduro, apresenta atividade antimutagênica.

Sugere-se que mais estudos sejam realizados no sentido de trazer resultados mais conclusivos tanto *in vivo* quanto *in vitro* para a perspectiva abordada no presente trabalho. O teste do micronúcleo é de grande credibilidade nos meios científicos, mas aqui serviu como uma primeira abordagem neste estudo, o Teste do Cometa, por exemplo, poderia responder se ocorrem lesões no DNA, trazendo informações sobre a cinética e o tipo de lesão a ser reparada (RIBEIRO *et al.*, 2003).

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> Acesso em: 04/07/2001.

ALBERTI-FIDANZA, A.; BURIN, G.; PERRIELO, G. **Total antioxidant capacity of colostrum, and transitional and mature human milk**. J. Mat. Fet. Neo. Med. v. 11, p. 275-279, 2009.

ALY, F.A.; DONYA, S. **In vivo antimutagenic effect of vitamins C and E against rifampicin-induced chromosomal aberrations in mouse bone-marrow cells**. Mutat. Res. n. 518, p.1–7, 2002.

ANDERSON, D.; BASARAN, N.; BLOWERS, S.D.; EDWARDS, A.J. **The Effect of antioxidants on bleomycin treatment in vitro and in vivo Genotoxicity assays**. .Mutat.Res. n. 329, p.37–47.1995.

ASSAYED, M.E.; KHALAF, A.A.; SALEM, H.A. **Protective effects of garlic extract and vitamin C against *in vivo* cypermethrin-induced cytogenetic damage in rat bone-marrow**. Food and Chem. Toxicol. v. 48, p. 3153–3158, 2010.

BARCELOS, G.R.F.; SHIMABUKURRO, F.; MORI, M.P; MACIEL, M.A.M. **Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of cashew bark methanolic extract in vitro**. J. of EthnoF. v. 114, n. 2, p. 268-273, 2007.

BARD EL-DIN, N.K.; OMAÏE, S.T. **Concentration dependent antioxidant activities of conjugated Linoleic acid and a-tocopherol in corn oil**. Br. J. Nutr. n.60, p. 32–37, 2007.

BHUNYA, SP.; PATI, PC. **Genotoxic effects of a synthetic pyrethroid insecticide, cypermethrin, in mice in vivo**. Toxicol. Letters. v. 41, n. 3, p. 223-230, 1988.

BRENNER, D.E. **Multiagent chemoprevention: An overview**. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. Education Book. p. 124, 2005.

BUESCHER, E.S.; MCLLHERAN, S.M.; FRENCK, R.W. **Further characterization of human colostrum antioxidants: identification of an ascorbate-like element as an antioxidant component and demonstration of antioxidant heterogeneity.** *Pediat. Res.* n. 25, p. 266-270, 1989.

BOWNMAN, H.; SEREDA, B.; MEINHARDT, H.M. **Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa.** *Environ. Pollut.* v. 144, p. 902-917, 2006.

BOSSOLAERS, I.E.; CAENSSES, P.W.; VAN BOECKEL, M.A.; ALINK, G.M., **Differential effects of milk proteins, BSA and soy protein on 4NQO- or MNNG-induced SCEs in V79 cells.** *Food Chem. Toxicol.* n.32, p. 905–909, 1994.

CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCIA, O.; LORENTE, J.; ALCARAZ, M.; REDONDO, A.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J.A. **Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (Vitis vinifera): comparative study versus other phenolic and organic compounds.** *J. Agric. Food Chem.* v. 48, p.1738–1745, 2000.

CAVALCANTE, J.L.P.; TELLES, F.J.S.; PEIXOTO, M.M.L.V.; RODRIGUES, R.C.B. **O uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v. 25, n. 1, p. 103-108, 2005.

CONWAY, P.; NAPOLI, J.E.; BRAND-MILLER, JC. **Bifidogenic effects of feeding infant formula containing galacto-oligosaccharides in healthy formula-fed infants.** *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* v.12, 2003.

DUFFUS, J.H.; WORTH, H.G.J. **Fundamental Toxicology.** RSC publishing. UK. n. 2, 2006.

EL-ASHMAWY, .IN.; ZAKARIA, AD.; HEMED, SMA.; EL-FIKEY, S.; HUSSEIN, YA. **Cytotoxic effect of the pyrethroid insecticide (Matox) with reference to its influence on the reproductive hormone.** *Vet. Med. J.* v. 41, n. 3, p 125-130, 1993.

FISCHER, W.; GUSTAFSSON, L.; MOSSBERG, A.K.; GRONLI, J.; MORK, S. **Human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival.** *Cancer. Res.* v. 64, p. 2105–2112, 2004.

FRANCIS, J.; ROGERS, K.; BREWER, P.; DICKTON, D.; PARDINI, R.; **Comparative analysis of ascorbic acid in human milk and infant formula using varied milk delivery systems.** *Int. Breastfeed J.* v. 3, n. 19, 2008.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. **DNA repair and Mutagenesis.** Washington DC. Library of Congress, 1995.

GAJATE, C.; A.N, F.; MOLLINEDO, F. **Differential cytostatic and apoptotic effects of ecteinascidin-743 in cancer cells.** *The J. of Biol. Chem.* v. 227, p. 41580-41589, 2002.

GOEPTAR, A.R.; VAN BOECKEL, M. A. J. S.; ALINK, G.M. **Antimutagenic activity of casein against MNNG in the *E. coli* DNA repair host-mediated assay.** *Cancer letters.* v. 114, n. 1, p. 85-87, 1997.

GUSTAFSSON L.; LEIJNHUFYUD I.; ARONSSON A; MOSSBERG A.K.; SVANBORG C. **Treatment of skin papillomas with topical alpha-lactalbumin-oleic acid.** *N. Engl. J. Med.* v. 350, p. 2663–2672, 2004.

HAMOSH, M.; ELLIS, L.A.; POLLOCK, D.R.; HENDERSON, T.R.; HAMOSH, P. **Breastfeeding and the working mother: effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk.** *Pediatrics.* v. 97, p. 492- 498, 1996.

HAKANSSON A.; ZHIVOTOVSKY B.; ORRENIUS S.; SABHARWAL, H.; SVANBORG C. **Apoptosis induced by a human milk protein.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* v.92, n. 17, p. 8064–8068, 1995.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRHART, B.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. **The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity.** *Mutat. Res.* v. 123, p. 61-118, 1983.

HEUDORF, U.; ANGERER, J. **Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany.** Environ. Health Perspect. v.109, n. 3, p. 213-217, 2001.

HOOPER, K.; HOOPER, K.; PETREAS, M.X.; SHE, J.; VISITA, P.; WINKLER, J.; MCKINNEY, M.; MOK, M.; GARCHA, J.; GILL, M.; STEPHENS, R.D.; SEMEONOVA, G.; SHARMANOV, T.; CHUVAKOVA, T. HOOPER, K. **Analysis of breast milk to assess exposure to chlorinated contaminants in Kazakstan: PCBs and organochlorine pesticides in southern Kazakstan.** Environ. Health. Perspect. v.105, n. 11, p. 1250–1254,1997.

INSTITORIS, L.; UNDEGEGER, U.; SIROKI, O.; NEHEZ, M; DESI, I. **Comparison of detection sensitivity of immuno- and genotoxicological effects of subacute cypermethrin and permethrin exposure in rats.** Toxicol. v.137, n. 1, p. 47-55, 1999.

KANYSHKOVA, T.G.; BUENA, V.N.; NEVINSKY, G.A. **Lactoferrin and its biological finctions.** Biochemistry. v.66, p.1-7, 2001.

KASAPOVIC, J.; PEJIC, N.; MLADENOVIC, M.; RADLOVIC, N.; PAJOVIC, S.B. **Superoxide dismutase activity in colostrum, transitional and mature human milk.** The Turk. J. of Ped. v.47, n. 4, p. 343-347, 2005.

KISHI, M.; HORIGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M. **Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane.** Mutat. Res. v.278, p. 205-208, 1992.

KRISHNA, G.; NATH, J.; ONG, T. **Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin-C induced sister chromatide xchanges in miceby vitaminC.** Cancer Res. v. 46, p. 2670–2674. 1986.

KUREK, A.G. **Efeitos do agente antiproliferativo de origem marinha ET-743 sobre o ciclo celular, apoptose e conteúdo de proteína Hsp70 emculturas de glioma humano.** Dissertação. UFRGS. Porto Alegre, 2005, 85 p.

LIEW, C.; SCHUT, H.A.; CHIN, S.F.; PARIZA, M.W.; DASHWOOD, R.H. **Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3- methyl-imidazo**

**[4,5-f] quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms.** Carcin. n.16, p. 3037–3043, 1995.

LUTY, S.; LATUSZYNSKA, J.; OBUCHOWSKA-PRZEBIROWSKA, D.; TOKARSKA, M.; HARATYM-MAJ, A. **Subacute toxicity of orally applied Alpha-Cypermethrin in Swiss mice.** Ann. Agricu. Environ. Med. v.7, p.33-41, 2000.

MORERA-PONS, S.; CASTELLOTE-BARGALLÓ, A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. **Evaluation by highperformance liquid chromatography of the hydrolysis of human milk triacylglycerides during storage at low temperatures.** J. Chromatography. v. 823, p. 467-474, 1998.

MOSSBERG, A.K.; WULLT, B.; GUSTAFSSON, L.; MANSSON W.; LJUNGGREN, E. **Bladder cancers respond to intravesical instillation of HAMLET (human alphasalalbumin made lethal to tumor cells).** Int. J. Cancer. v.121, p.1352–1359, 2007.

NASUTI, C.; CANTALAMESSA, F.; FALCONI, G.; GABBIANELLI, R. **Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats.** Toxicol. v.191, n.2-3, p. 233-244, 2003.

OLGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia.** 3º Ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

PATEL, S.; PANDEY, A.K.; BAIPAYEE, M.; PARMAR, D.; DHAWAN, A. **Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from the comet assay.** Mutat. Res./Gen. Toxicol. and Environ. Mut. v. 607, n. 2, p.176-183, 2006.

PORVICK, L.F.; AUSTIN, M.J.F. **Genotoxicity of bleomycin.** Mutat. Res. v. 257, p.136–137.1991.

PUIG, M.; CARBONELL, E.; XAMENA, N.; CREUS, A.; MARCOS, E. **Analysis of cytogenetics damage induced in culture human lymphocyte by the**



**pyrethroid inseticides cypermethrin and fenvalerate.** *Mutagenesis.* n 4, p. 72-74, 1989.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.** *Rev. Bras. de Gen.* Ribeirão Preto, 1991.

REZENDE, A.A.A.; GRAF, U.; GUTERRES, Z.R.; KERR, E.W.; SPANÓ, M.A. **Protective effects of proanthocyanidins of grapes (*Vitis vinifera* L) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*.** *Food and chem.. Toxicol.* v. 47, n. 7, p. 1466-1472, 2009.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental.** Canoas-RS. Editora da ULBRA, 2003.

RUDDON, R.W. **Cancer Biology.** 4 ed. Oxford University Press, 2007, 530p.

SALWA, M.Q.; LINA, A.F.K. **Antigenotoxic anticytotoxic of camel milk in mice treated with cisplatin.** *Saud. J. of Biol. Scien.* v. 17. p. 159-166, 2010

SANKAR, P., TELANG, A.G. MANYMARAN, A. **Curcumin protects against cypermethrin induced genotoxicity in rats.** *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* v. 30, n. 3, p. 289-291, 2010.

SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G. **Piretróides – uma visão geral.** *Alim. Nutr.* v.18, n. 3, p. 339-349, 2007.

SANTOS, R.A.; TAKAHASHI, C.S. **Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage *in vitro* in human lymphocytes.** *Food and Chem. Toxicol.* v.46, n. 2, p. 671-677, 2008.

SCHINAS, V.; LEOTSINIDIS, M.; ALEXPOULOS, A.; TSAPANOS, V.; KONDAKIS, X.G. **Organochlorine Pesticide Residues in Human Breast Milk from Southwest Greece: Associations with Weekly Food Consumption Patterns of Mothers.** *Arch. of Envir. Health: An International Journal.* v. 55, 2000.

SHOJI, H.; SHIMIZU, T.; SHINOHARA, K.; OGUCHI, S.; SHIGA, S.; YAMASHIRO, Y. **Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants.** Arch. Dis. Child Fet. Neo. v. 89, n. 2, p.136–138, 2004.

SKAARE, J.U.; POLDER, A. **Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in milk of Norwegian women during lactation.** Arch. Env. Con. Tox, v. 19, p. 640-645, 2005.

SPENCER, C. I.; YUILL, K.H; BORG, J.J.; HANCOX, J.C.; ROLAND, Z.K. **Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts.** J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 298, n. 3, p.1067-1082, 2001.

SURRALLÉS, J.; XAMENA, N.; CREUS, A.; CATALÁN, J.; NORPPA, H.; MARCOS, R. **Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures.** Mutat. Res./Gen. Toxicol. v. 341, n. 3, p. 169-184, 1995.

SURRALLÉS, J.; NATARAJAN, A. T. **Human lymphocytes Micronucleus Assay in Europe. An international survey.** Mutat. Res. v. 392, p. 165-174, 1997.

SVENSSON, M.; HAKANSSON, A.; MOSSENBERG, A.K.; LINSE, S.; SVANBORG, C. **Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis.** Proc. Nat. Acad. Sci. v. 97, p. 4221–4226, 2000.

TALIB, W.M.; MAHASNEH, A.M. **Antiproliferative Activity of Plant Extracts Used Against Cancer in Traditional Medicine.** Sci. Pharm. v.78, n.1, p. 33–45, 2010.

TIAN, YT.; LIU, ZW.; YAO, Y.; ZHANG, T.; YANG, ZHUO. **Effects of alpha- and theta-cypermethrin insecticide on transient outward potassium current in rat hippocampal CA3 neurons.** Pest. Biochem. And Physiol. v. 90, n. 1, p. 1-7, 2008.

VAN DE PERRE, P. **Transfer of antibody via mother's milk.** *Vaccine.* v.21, n. 24, p. 3374-3376, 2003.

WALISZEWSKI, S.M.; AGUIRRE, A.A.; INFANZON, R.M.; C.S. SILVA.; SILICEO, J. **Organochlorine Pesticide Levels in Maternal Adipose Tissue, Maternal Blood Serum, Umbilical Blood Serum, and Milk from Inhabitants of Veracruz, Mexico.** *Arch. Env. Cont. Toxicol.* V.40. n 3, p.432-438, 2001.

WILSON-SANCHEZ, G.; MORENO-FÉLIX, C., VELASQUEZ, C., PLASCENIA-JATOMEA, M., ACOSTA, A., MACHI-LARA, L., MADRID, MLA., BRAUER, JME., ROBLES-ZEPEDA, R., HERNANDES, AB. **Antimutagenicity and Antiproliferative Studies of Lipidic Extracts from White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*).** *Mar Drugs.* v.8. n.11. p. 2795–2809, 2010.

WITT, K.L.; LIVANOS, E.; KISSLING, G.E.; TOROUS, D.K.; CASPARY, W.; TICE, R.R.; RECIO, L. **Comparison of flow cytometry- and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals.** *Mutat. Res.* v. 64, p.101–113, 2008.

# **ANEXOS**

## Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CESED

CEUA: nº11

PROJETO: 005/220611

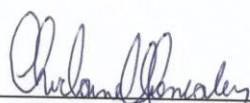
PESQUISADOR: José Cavalcante da Silva

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação do Potencial Antimutagênico do Leite Humano na Interação com a Alfa Cipermetrina pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos Swiss Albino.

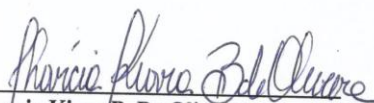
### Parecer:

O projeto apreciado está de acordo com a resolução 714/2002 do Conselho Federal de medicina Veterinária e com as Normas e Princípios Éticos em Experimentação Animal preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Havendo sido cumprido pelo pesquisador responsável os critérios estabelecidos nesta CEUA consideramos o pedido APROVADO.

Campina Grande, 21/06/2011.



Chirlaine Cristine Gonçalves  
Coordenadora CEUA/CESED



Tharcia Kiara B. De Oliveira  
Vice – Coordenadora CEUA/CESED  
Médica Veterinária Biotério/CESED

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA-UEPB  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA-PRPGP  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP**

**FORMULÁRIO DE PARECER DO CEP – UEPB**

**PROJETO: CAAE 0161.0.133.000-11**

**PARECER**

**APROVADO**

**NÃO APROVADO**

**PENDENTE**

**TÍTULO: Avaliação do potencial antimutagênico do Leite Humano em interação com a Cipermetrina pelo teste do micronúcleo em camundongos**

**PESQUISADOR(A): José Cavalcanti da Silva**

**ORIENTANDO(A): Alexandre Sarmiento Queiroga**


**PARECER:** O presente Projeto de Pesquisa tendo como Objetivo Geral “Avaliar potencial antimutagênico do LH em camundongos tratados com Cipermetrina (CIP)” nos traz, a priori, relevância científica, consoante proposta apresentada pelo Pesquisador e orientando supramencionados.

Ao reavaliarmos o presente projeto, verificamos que foram acatados e efetivados os devidos esclarecimentos propostos por este Comitê. Assim, tendo por base a resolução 196/96 do CNS/MS, que disciplina a matéria em análise; como a partir da RESOLUÇÃO/UEPB/CONSEPE/10/2001, que rege este Comitê de Ética em Pesquisa entendo pela aprovação deste protocolo de pesquisa.,

Campina Grande, 08/06/2011

Relator: 11

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA/  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA/  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

  
Prof.ª Dra. Doralúcia Pedrosa de Araújo  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa



PREFEITURA DE CAMPINA GRANDE  
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE  
INSTITUTO DE SAÚDE ELPÍDIO DE ALMEIDA

## DECLARAÇÃO

Declaro para fins de comprovação, que foi doado por esta Instituição a quantia de 100 ml de Leite Materno para o projeto de pesquisa intitulado: “*Avaliação do Potencial Antimutagênico do Leite Humano em Interação com a Cipermetrina Pelo Teste do Micronúcleo em Sangue Periférico de Camundongos*”, o mesmo orientado pelo professor José Cavalcanti da Silva.

Campina Grande, 04 de Fevereiro de 2010.

Dra. Josélia Alves de Moura  
Coord. BLH ISEA

Rua Vila Nova da Rainha, 147 - Centro - 58400-220 - Campina Grande - PB - ☎  
(083)3310-6356 FAX 3310-6388 E-mail: iseacg@hotmail.com



HOSPITAL AMIGO DA CRIANÇA ☺

## DECLARAÇÃO

Declaro que para os devidos fins, eu Milano Sales de Melo, médico veterinário registrado no CRMV sob o número 0827/PB, assumo a colaboração no processo de eutanásia das cobaias a serem usadas no Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do potencial antimutagenico do Leite Humano na interação com a Alfa Cipermetrina pelo teste do Micronúcleo em Camundongos Swiss albino" referente ao Trabalho de Conclusão de Curso do aluno Alexandre Sarmiento Queiroga, do curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, número de matrícula 072110384, RG 29.804.27 SSP/PB, CPF 065.295.384-02, sob a orientação do Prof°. Msc. José Cavalcanti da Silva RG 172245 SSP/PB, CPF 205.177.774-87 pertencente ao Departamento de Biologia da instituição supracitada.



Milano sales de Melo

**Milano Sales de Melo**  
Médico Veterinário - CRMV 0827-PB.  
Credenciado 002/07 de 05/03/07 SEDAPIB.  
Habilitado Portaria nº 0014/05 MAPA/SEFA/PB.

CAMPINA GRANDE  
2011



Tabela 2 Valores de F para o nível de significância de 5% segundo o número de graus de liberdade do numerador e do denominador.

Nº de graus de liberdade do denominador	Nº de graus de liberdade do numerador								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241
2	18,5	19,0	19,2	19,2	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4
3	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34
23	4,28	3,42	3,03 <sup>b</sup>	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32
24	4,26	3,40	3,01	2,78 <sup>a</sup>	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53 <sup>b</sup>	2,42	2,33	2,27	2,21
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96