

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIGENOTÓXICO DO EXTRATO DE *Brassica oleracea* in vivo

ÁLVARO LUIZ MARTINI GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas*.

Orientador: *Prof. Dr. Edson Luis Maistro*

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E
ANTIGENOTÓXICO DO EXTRATO DE *Brassica oleracea in vivo***

ÁLVARO LUIZ MARTINI GONÇALVES

PROF. DR. EDSON LUIS MAISTRO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas*.

Orientador: *Prof. Dr. Edson Luis Maistro*

**BOTUCATU – SP
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Gonçalves, Álvaro Luiz Martini

Investigação do potencial genotóxico e antigenotóxico do extrato de
Brassica oleracea in vivo / Álvaro Luiz Martini Gonçalves. - Botucatu, 2012

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2012

Orientador: Edson Luis Maistro

Capes: 20206003

1. Análise do DNA. 2. Mutagênese. 3. Plantas medicinais. 4. Célula.

Palavras-chave: *Brassica oleracea*; Ensaio Cometa; Teste do Micronúcleo;
antigenotoxicidade.

*Dedico este trabalho a todos que, de alguma forma, me apoiaram durante
esta caminhada, em especial aos meus pais, irmãos e noiva.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ter me dado força, paciência, saúde, fé e a possibilidade de ter chegado até aqui com os estudos.

Aos meus pais, Luiz e Regina, por todos os motivos que me permitiram chegar até aqui; agradeço a vocês simplesmente por tudo! Sem vocês nada disso seria possível, e esta vitória também é de vocês! Muito obrigado!

À minha amada noiva Camomila, pelo amor, carinho, companheirismo, paciência e muita força nas horas difíceis, sempre com um gesto alegre e doce reservado para me fazer sorrir. Eu amo você.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Luis Maistro, por abrir as portas do laboratório a este até então desconhecido, pela orientação, paciência, amizade e respeito. Tenha a certeza de que é, para mim, um exemplo de professor e profissional ético.

Aos meus irmãos, Gabriel (Bié), Aline (Tata) e Júlia (Ju), por existirem em minha vida e sempre me apoiarem de alguma forma. Também à minha sobrinha e afilhada Isadora, que com sua pureza e alegria, torna os momentos do Dindo mais felizes.

Aos meus grandes parceiros, Eduardo de Souza Marques (Du) e Rafael Palhano Fedato (Rafa), pela amizade verdadeira criada nestes dois anos, pela ajuda sempre de prontidão e pelas gargalhadas compartilhadas tanto no laboratório, quanto nas viagens à Botucatu.

Tenham a certeza de que sem vocês tudo seria mais difícil e muito mais chato! Contem sempre comigo.

A todos os colegas que passaram ou que ainda estão no nosso laboratório, em especial à Patrícia, Priscila, Flora, Peterson, Larissa, pela colaboração e por tornarem a rotina muito mais prazerosa.

À Prof. Dra. Flavia Goulart, pela convivência sempre harmoniosa, amizade e pelas dicas sempre muito valiosas.

À Tati e à Ju, da empresa Calcular, por sempre disponibilizarem um pouco do seu tempo para me ajudar com as cópias, impressões e encadernações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, pela excelente formação e estrutura a que tive a honra de ter acesso.

A todos da Seção de Pós-Graduação, Davi, Lu(s) e Herivaldo, por todos os atendimentos, sempre atenciosos e comprometidos em colaborar.

À CAPES, pela bolsa que proporcionou dedicação total a este projeto de mestrado.

Aos professores da banca avaliadora, Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani e Prof. Dra. Wilma De Grava Kempinas, por dedicarem um pouco do seu escasso tempo para a análise desta dissertação.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Pg.
Figura 1 – Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos.....	16
Figura 2 – Classes de cometa observadas: 0, 1, 2 e 3, respectivamente.	21
Figura 3 – Formação do micronúcleo em eritrócitos. Agentes genotóxicos induzem a formação de quebras ou a não-disjunção dos cromossomos nas células.....	23
Tabela 1 – Migração do DNA pelo ensaio cometa para a avaliação da genotoxicidade do extrato de <i>Brassica oleracea</i> , em diferentes células de camundongos suíços machos <i>in vivo</i>	47
Tabela 2 – Migração do DNA pelo ensaio cometa para a avaliação da antigenotoxicidade do extrato de <i>Brassica oleracea</i> , em diferentes células de camundongos suíços machos <i>in vivo</i>	48
Tabela 3 – Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) observados em células de medula óssea de camundongos suíços machos, tratados com extrato de <i>Brassica oleracea</i> , e respectivos controles. Duas mil células foram analisadas.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BOE – *Brassica oleracea extract*

C - Celsius

CEP/FAMEMA – Comitê de Ética em Pesquisa/Faculdade de Medicina de Marília

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DXR – Doxorubicina

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

g – Grama

h - Hora

M – Molar

mA - Milliampère

mg/kg – Miligrama/quilograma

min - Minuto

mL – Mililitro

mM - Milimolar

MN – Micronúcleo

MNCB – Micronúcleo em células binucleadas

MNPCE – Eritrócitos policromáticos micronucleados

N - Normal

NCE - Eritrócitos normocromáticos

nm - Nanômetro

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCE – Eritrócitos policromáticos

pH – Potencial hidrogeniônico

SC – Santa Catarina

SCGE – *Single Cell Gel Electrophoresis*

SD – *Standard Deviation*

TLC – *Thin Layer Chromatography*

uL – Microlitro

uL/mL – Microlitro por mililitro

V – Volt

RESUMO

Brassica oleracea é uma espécie botânica popularmente conhecida como “couve”. É utilizada na alimentação e também na medicina popular, devido às suas ações antiulcerogênica e quimiopreventiva do câncer, entre outras. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico e antigenotóxico do extrato de folhas de *Brassica oleracea* em células somáticas e germinativas de camundongos *in vivo*, usando o Ensaio Cometa e o teste do micronúcleo. Os animais (camundongos Swiss albinos machos) foram divididos em oito grupos experimentais (n=6). O grupo controle negativo recebeu água destilada e o controle positivo 80 mg/kg de doxorubicina (DXR). Três diferentes doses do extrato foram testadas (500, 1000 e 2000 mg/kg) para a avaliação do potencial genotóxico. As mesmas doses do extrato foram utilizadas simultaneamente com injeção intraperitoneal de DXR (uma hora após o tratamento com o extrato via gavagem), para a avaliação dos potenciais antigenotóxico e anticlastogênico/antianeugênico. As células analisadas pelo Ensaio Cometa foram leucócitos de sangue periférico coletados 4 e 24 horas após os tratamentos, e células do fígado, cérebro, medula óssea e testículos, coletadas 24 horas após os tratamentos. Para o Teste do Micronúcleo, foram analisadas células de medula óssea, coletadas 24 horas após os tratamentos. Os dados obtidos foram estatisticamente analisados utilizando-se ANOVA e teste de Tukey-Kramer. A ausência de genotoxicidade e aneugenicidade/clastogenicidade foi observada para as três doses do extrato. No entanto, as três doses testadas induziram um decréscimo significativo de danos no DNA das células analisadas pelo Ensaio Cometa, assim como redução no número de eritrócitos policromáticos micronucleados analisados pelo Teste do Micronúcleo, em comparação ao grupo controle positivo tratado com DXR. Sob as condições experimentais deste estudo, os resultados obtidos demonstraram que o extrato de folhas de *Brassica oleracea* não é genotóxico e apresenta um efeito quimioprotetor contra danos no DNA induzidos pela DXR.

ABSTRACT

Brassica oleraceae is a botanical specie popularly known as “kale”. Is used in the feeding and also in folk medicine due to its anti-ulcerogenic and cancer chemopreventive activities, among others. The main objective of the present study was to evaluate the genotoxic and antigenotoxic potential of the *Brassica oleraceae* extract in different cells of mice *in vivo*, using the comet assay and micronucleus test. The animals (male Swiss mice) were divided in eight experimental groups (n = 6). The negative control group received distilled water and the positive control 80mg/kg of doxorubicin (DXR). Three different doses of the extract were tested (500, 1000 and 2000 mg/kg) to evaluate the genotoxic potential. The same extract doses followed by DXR injection (one hour after the treatment) were used to evaluate the antigenotoxic and anticlastogenic/antianeugenic potentials. The cells analyzed by comet assay were leukocytes from peripheral blood collected 4 and 24 hours after the treatments, and liver, brain, bone marrow and testicles cells collected 24 h after the treatments. Bone marrow cells collected 24 hours after the treatments were analyzed by micronucleus test. The data were statistically analyzed using ANOVA and Tukey-Kramer test. The absence of genotoxic and aneugenic/clastogenic effects was observed with the three tested doses of the extract. On the other hand, the three tested doses of the extract induced a significant decrease in the DNA damage in all cells analyzed by comet assay, and a reduction in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes, in comparison with DXR positive control group. Under the experimental conditions employed in the present experiment, the results obtained showed that *Brassica oleraceae* extract is not genotoxic and presents a clear chemoprotection against DNA damage induced by doxorubicin.

SUMÁRIO

□□□

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Considerações sobre mutagênese e mutação.....	15
1.2. Considerações sobre antimutagênese.....	17
1.3. Ensaio mais comuns para a avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade.....	18
1.3.1. Ensaio Cometa ou <i>Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)</i>	19
1.3.2. Teste do Micronúcleo (MN).....	22
1.4. Considerações sobre <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> D.C.....	25
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. REFERÊNCIAS	27
4. ARTIGO – Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> D.C. in different cells of mice.....	31
5. ANEXOS	50
ANEXO 1 – Carta de submissão do artigo “Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> D.C. in different cells of mice”.....	50
ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética Experimental da Faculdade Medicina de Marília, SP	51

1. INTRODUÇÃO

Muitas espécies de plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de doenças em todo o mundo. No entanto, a maioria dessas espécies não foi suficientemente estudada, principalmente quanto à presença de substâncias citotóxicas e/ou mutagênicas em sua composição ou decorrentes do próprio metabolismo e podem causar danos à saúde da população (BAGATINI et al., 2007).

As plantas medicinais têm sido um importante recurso terapêutico desde os primórdios da humanidade até os nossos dias (ALVES & SILVA, 2002). Fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004a).

A atenção dirigida pelas autoridades e administrações de saúde para o uso de plantas medicinais aumentou consideravelmente nos últimos anos, por diferentes razões e em diferentes setores. Incentivo em investimentos públicos em plantas medicinais tem sido feito pela OMS desde 1978, observando-se a crescente aceitação da fitoterapia por profissionais de saúde da atenção básica, assim como a observação do aumento de seu uso pela população (HOMAR, 2005).

O homem moderno está exposto no seu dia-a-dia à inumerável quantidade de substâncias químicas sintéticas ou de origem natural. Não há dúvidas de que muitos destes compostos são essenciais para o conforto e a segurança do ser humano, como por exemplo os medicamentos, os corantes, conservantes, cosméticos, inseticidas, desinfetantes e muitos outros. Por outro lado, muitos destes produtos podem causar grandes transtornos à sociedade como poluentes do ar, água e solo. Além disso, cresce o número de evidências acerca da associação entre a exposição a determinados agentes químicos e uma série de doenças e alterações metabólicas prejudiciais à saúde humana (VARANDA, 2006).

A exposição humana aos denominados agentes mutagênicos, efetivos em causar danos ao material genético, constitui uma das grandes preocupações no mundo atual. Tais agentes estão relacionados com o desenvolvimento de câncer, hoje considerado doença genética, uma vez que

resulta de alterações em genes que controlam a proliferação e a diferenciação celular (protooncogenes e genes supressores de tumor), ou de alterações em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA (MEIRELES et al., 2006).

Assim, pesquisas por agentes que possam reduzir a frequência de alterações no DNA têm se mostrado promissoras e com importantes implicações nas práticas terapêuticas devido à possibilidade da redução da taxa de mutações e consequente diminuição na incidência de câncer. Dentre estes agentes, estão as plantas com potencialidade medicinal. Sua utilização remonta séculos e a popularidade das mesmas está conectada ao fácil acesso, eficácia terapêutica, baixo custo relativo e impressão de total ausência de efeitos tóxicos. Entretanto, recentemente a segurança de alguns destes compostos fitoterápicos têm sido questionada, devido a relatos de toxicidade e fatalidades.

Neste contexto, a Genética Toxicológica é uma área que tem se dedicado à pesquisa das propriedades genotóxicas e mutagênicas de agentes aos quais os organismos estão expostos, fazendo uso de diversos ensaios que avaliam o dano que estes podem vir a causar ao DNA na presença ou ausência de sistemas de metabolização (COSTA, 2006). Da mesma forma, é válido ressaltar que esta área também nos permite buscar agentes que possam reduzir os danos no DNA causados por agentes com propriedades genotóxicas e mutagênicas.

Para avaliação de substâncias genotóxicas ou antígenotóxicas, que permite estudar a segurança e efetividade das mesmas, utiliza-se o Ensaio Cometa ou *Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE)*; já as substâncias com propriedades mutagênicas, sobretudo aneugênica e clastogênica, e ainda antimutagênica, podem ser avaliadas através do Teste do Micronúcleo. Ambos os testes podem ser aplicados na versão *in vivo*, utilizando-se em geral células de mamíferos (principalmente camundongos), ou na versão *in vitro*, com uma ampla gama de linhagens celulares, de roedores ou humanos, metabolizadoras ou não.

Portanto, os estudos de genotoxicidade ajudam na avaliação da segurança e da efetividade dos produtos naturais (BAST, 2002). Por esta razão, a avaliação do potencial

genotóxico/mutagênico dos agentes terapêuticos, naturais ou sintéticos, é recomendada por órgãos reguladores nacionais e internacionais (CNS, RESOLUÇÃO N° 251/97; OECD, 2007).

Um aspecto que merece destaque, neste momento, é a diferença entre genotoxicidade e mutagenicidade. Genotoxicidade é um termo amplo e refere-se ao efeito potencial de danos no material genético, que não está necessariamente associado com mutagenicidade. No entanto, testes de genotoxicidade dão uma indicação de danos induzidos no DNA (SCCNFP, 2003).

1.1. Considerações sobre mutagênese e mutação

A mutagênese é a ciência que estuda o processo de indução de danos no DNA pela ação de agentes químicos, físicos e biológicos. A mutação consiste em toda alteração do material genético que não resulta dos processos de segregação ou recombinação, capaz de influenciar ou não a atividade normal da unidade genética onde ocorreu (LEWIN, 2000).

As mutações podem ocorrer nas células somáticas e nas células germinativas dos organismos. Quando a mutação ocorre em células somáticas pode ocorrer propagação durante a proliferação celular e envolver-se com o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como aterosclerose, doenças cardíacas e câncer (DE FLORA; FERGUSON, 2005). Se as mutações ocorrem em células germinativas, elas podem ser transmitidas para todas as células dos descendentes, podendo afetar as gerações futuras, sendo a causa de diversas doenças hereditárias e síndromes (RIBEIRO et al., 2003).

Pesquisas apontam que a maioria dos carcinógenos são mutágenos, indicando, assim, uma grande correlação entre a mutagênese e a carcinogênese. Daí percebe-se a grande importância da Genética Toxicológica e seu papel em avaliar o potencial genotóxico de agentes biológicos, físicos e químicos (MacGREGOR et al., 2000).

A mutação pode ser dividida, em linhas gerais, em Mutação Cromossômica e Mutação Gênica. A primeira ocorre quando há quebra ou rearranjo cromossômico e a segunda quando

ocorre a alteração de um alelo de um gene, tornando-se um alelo diferente, sendo chamada também de “mutação de ponto”, uma vez que tal alteração ocorre dentro de um único gene e está em um *locus* cromossômico (ponto) (NUSSBAUM et al., 2006).

Lesões persistentes no DNA levam a um aumento da mutagênese pela maior probabilidade de ocorrerem erros quando a replicação ocorrer em um molde alterado. Com o objetivo de manter o genoma íntegro, as células desenvolveram mecanismos de reparação de danos ao DNA (PINTO; FELZENSZWALB, 2003).

Os agentes mutagênicos são aqueles que alteram a sequência nucleotídica, podendo acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias (RIBEIRO et al., 2003). Na **Figura 1**, são apresentados exemplos de fontes de exposição humana a agentes mutagênicos.

TIPO	EXEMPLO
Endógenos	Óxido Nítrico Radicais livres de oxigênio Formação de nitrosaminas endógenas
Ocupacional	Produtos Petroquímicos Produção de energia nuclear Produção de ferro e aço
Dieta	Mutágenos naturais presentes na dieta Mutágenos gerados durante o cozimento de alimentos Mutágenos gerados no processo de conservação dos alimentos
Radiação	Exposição médica – Raio X Exposição a lixo nuclear
Poluição	Efluentes industriais Sub – produtos da cloração da água Emissões por motores de veículos Pesticidas usados na agricultura Incineração de lixo
Biológico	Mutágenos originados de infecção crônica por vírus, bactérias ou parasitas

Figura 1 - Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Um agente mutagênico é capaz de produzir diferentes eventos mutacionais em organismos com constituição genética distintas. Contudo, a maior parte destes agentes exibe um espectro de mutações característico, que depende de vários fatores, incluindo a natureza das alterações primárias no DNA (por ex.: modificações de base, de resíduos de açúcar ou fosfato, quebras de filamentos, ou incorporações de bases modificadas), e os efeitos secundários causados pela resposta do organismo a estas modificações (por ex.: a ação de várias formas de reparo do material genético e a duplicação de cromossomos sobre moldes modificados) (PRESTON et al., 1987; ZAHA, 1996). Esses agentes podem interagir diretamente com a molécula de DNA ou tornarem-se mutagênicos ao sofrer reações metabólicas no organismo vivo (VARELLA et al., 2004). Conhecer a propriedade mutagênica das substâncias ingeridas e utilizadas pela população é uma forma significativa de prevenção do desenvolvimento do câncer.

É válido ressaltar que, por outro lado, o aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos e exerce papel fundamental na evolução e diversificação das populações e espécies. Sem mutação, que é a principal das três fontes de variabilidade genética, não há evolução (RIBEIRO et al., 2003).

1.2. Considerações sobre antimutagênese

As doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, representam hoje as maiores causas de morte na população, e o controle destas enfermidades torna-se difícil por serem de origem multifatorial. No entanto, mudanças importantes têm ocorrido no cenário epidemiológico no intuito de diminuir a taxa de mortalidade por estas doenças (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). O termo antimutagênico foi usado originalmente por Novick e Szilard (1952) para descrever os compostos que reduzem as mutações espontâneas ou induzidas, independentemente dos

mecanismos de proteção envolvidos. O termo anticarcinogênico também é usado para os agentes que reduzem ou inibem o desenvolvimento de tumores (RESENDE, 2008).

Os agentes antimutagênicos podem ser divididos em duas categorias gerais: aqueles que inibem a formação de lesões e são classificados como desmutagênicos, e aqueles que colaboram no reparo das lesões que já estão presentes no DNA, denominados bioantimutagênicos (LIVIERO & VON BORSTEL, 1996).

Muitos compostos antimutagênicos vêm sendo estudados a partir de constituintes encontrados na natureza. A dieta tem sido relacionada à prevenção ou desenvolvimento de certas doenças. Os alimentos contêm compostos mutagênicos e/ou carcinogênicos, assim como antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos, sendo que alguns ocorrem naturalmente e outros podem ser introduzidos durante a preparação dos alimentos para o consumo humano. Estudos epidemiológicos sugerem uma redução na incidência de câncer associada com o consumo de alimentos que contêm fibras, vitaminas e minerais, e também frutas frescas e vegetais (FRANCY-GUILFORD; PEZZUTO, 2008).

1.3. Ensaios mais comuns para a avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade

Segundo Flores e Yamaguchi (2008), os testes de genotoxicidade incluem diversas metodologias, e representam uma importante parte da pesquisa para avaliação da mutagenicidade celular para identificar o potencial carcinogênico e a mutagenicidade do produto químico e, conseqüentemente, proteger o material genético humano. Os testes *in vivo* garantem a simulação perfeita de metabolização pelas vias normais de administração das substâncias, o que permite avaliar se é a substância ou um metabólito desta o responsável pelo efeito genotóxico e/ou antimutagênico. Por este motivo, foram utilizados neste estudo testes *in vivo*.

O ensaio cometa e o teste do micronúcleo estão entre os principais testes para a avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade, respectivamente, e têm grande aceitação na comunidade

científica. Segundo Valentin-Severin et al. (2003), a diferença entre os testes do cometa e do micronúcleo consiste basicamente no tipo de alteração detectada no DNA: o teste do cometa detecta lesões primárias, que muitas vezes são reparáveis, enquanto o teste do micronúcleo detecta lesões irreparáveis.

1.3.1. Ensaio Cometa ou *Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)*

O Ensaio Cometa, também conhecido por *Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)*, visa evidenciar a corrida de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrente em eletroforese, produzindo aspecto semelhante a um cometa; é um método rápido e sensível para a detecção de danos primários no DNA que tem sido amplamente utilizado na Genética Toxicológica por ser um teste relativamente simples, flexível, de rápidos resultados, onde um pequeno número de células por amostra e pequenas quantidades da substância teste são suficientes para conduzir um experimento (TICE et al., 2000).

O mecanismo principal, proposto por Östling e Johanson (1984), é que o DNA é organizado em grandes estruturas supercondensadas que, quando separadas por quebras na dupla-fita de DNA, podem migrar para o ânodo através da eletroforese, sendo que a aparência dos nucleóides submetidos ao teste levou o nome “*Comet Assay*” (RIBEIRO et al., 2003; TICE et al., 2000; KLAUDE et al., 1996). Com altas doses de irradiação gama, a cauda do cometa consiste em fragmentos de DNA que migram mais livremente no gel do que os DNA inteiros (ÖSTLING; JOHANSON, 1984).

A técnica foi modificada por Singh et al. (1988) que usaram eletroforese alcalina para analisar danos no DNA de tratamentos com raio-X ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nestas condições, a técnica permite detectar um mais amplo espectro de dano ao DNA - quebras de fita simples e dupla. O Ensaio Cometa tornou-se cada vez mais popular para mediar a dimensão e heterogeneidade dos danos causados por agentes genotóxicos em populações de células individuais. Para detectar o DNA, as lâminas são coradas e examinadas por microscopia de

fluorescência. Diferentes técnicas para quantificar cometas têm sido relatadas, que vão desde a simples medição do comprimento da cauda a cálculos mais complexos (DURAND; OLIVE, 1997). A análise dos cometas gerados (tamanho, intensidade da fluorescência, aspecto e outras características) pode ser feita visualmente ou de maneira automatizada, com programas computacionais próprios, sendo bastante concordantes os resultados fornecidos pelas duas formas de análise (TICE, 1995; COLLINS, 2004).

Para interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido entre cabeça e cauda. Assim células sem ou com pouco dano no DNA, não apresentariam cauda, enquanto células com mais danos apresentariam caudas maiores. Segundo Kobayashi et al. (1995), os cometas são divididos em quatro classes, de acordo com a extensão do dano gerado:

- *cometa classe 0* – nucleóides que não apresentam cauda;
- *cometa classe 1* – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide;
- *cometa classe 2* – nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide;
- *cometa classe 3* – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide.

A Figura 2 apresenta as quatro classes de cometa, de acordo com as descrições acima.

O número de publicações baseadas na técnica do cometa cresceu nos últimos anos, sendo a alcalina a técnica mais usada, com pequenas variações em alguns passos. Desde que a técnica se desenvolveu de forma empírica, houve a necessidade de padronizar e assegurar o entendimento dos mecanismos em que esta se baseia (KLAUDE *et al.*, 1996).

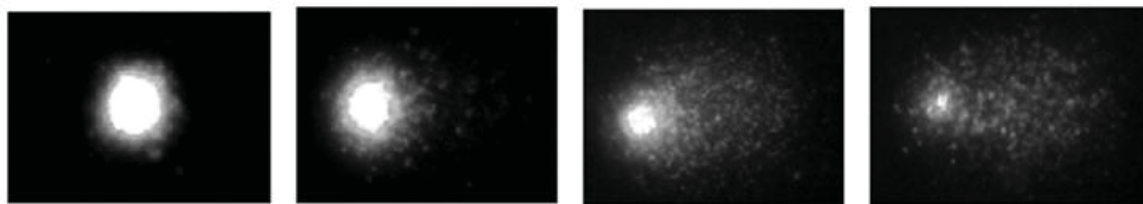


Figura 2 - Classes de cometa observadas: 0, 1, 2 e 3, respectivamente. (Fonte: BÜCKER et al., 2006).

Segundo Tice et al. (2000), existem algumas vantagens da técnica do cometa em comparação com outras técnicas para análise de danos no DNA, dentre elas:

- (1) Apresenta sensibilidade em apontar baixo nível de danos no DNA;
- (2) Requerimento de baixo número de células por amostras;
- (3) Flexibilidade;
- (4) Baixo Custo;
- (5) Fácil aplicação;
- (6) Habilidade de conduzir estudos utilizando pequenas porções de substâncias; e
- (7) Tempo relativamente curto para a realização de experimentos.

O teste do cometa, portanto, vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Este teste não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Assim sendo, este teste pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo. Uma vez que danos no DNA são frequentemente, célula e tecido-específicos, uma metodologia como o teste do cometa que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e consequentemente,

em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (RIBEIRO *et al.*, 2003; TICE *et al.*, 2000).

Assim, esta técnica, hoje em dia, é amplamente aceita e está sendo utilizada em uma variedade de áreas de investigação como: estudos de genotoxicidade, estudos de reparo do DNA, biomonitoramento ambiental, estudo de células apoptóticas, monitoramento humano, entre outras (ARAÚJO, 2008).

1.3.2. Teste do Micronúcleo (MN)

O Teste do Micronúcleo (MN) foi descrito por Schmidt, em 1975. É o ensaio mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos, sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendados para avaliação do potencial mutagênico, para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (CHOY, 2001). Segundo Valentin-Severin *et al.* (2003), uma substância micronúcleo positiva pode ser considerada mutagênica.

Os micronúcleos são resultantes de dois fenômenos básicos nas células mitóticas: quebra cromossômica e disfunção do aparato mitótico. São formados pelos cromossomos acêntricos ou fragmentos cromatídicos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasam na anáfase e são excluídos do núcleo-filho na telófase. Assim, os micronúcleos se formam pela extrusão de cromossomos inteiros ou seus fragmentos durante a divisão celular, sendo uma porção de cromatina resultante de mitoses aberrantes (REIS *et al.*, 2004). A Figura 3 representa a formação do micronúcleo induzida por um agente genotóxico.

O micronúcleo constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim sendo, o

micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico (AQUINO, 2010). Localizam-se à parte, sendo adicionados ao núcleo principal da célula; não apresenta membrana que os delimite e correspondem ao que se denomina na hematologia de Corpúsculo de Howell-Jolly (JOKSIÉ et al., 2004).

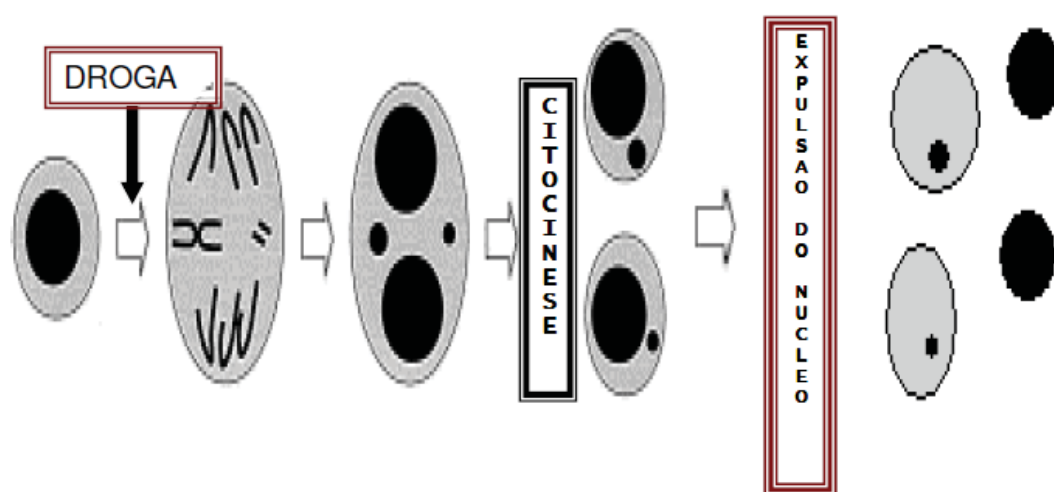


Figura 3 - Formação do micronúcleo em eritrócitos. Agentes genotóxicos induzem a formação de quebras ou a não-disjunção dos cromossomos nas células (adaptado de Ribeiro, 2006).

É válido ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Consequentemente, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (FENECH et al., 1999). Por isso, Fenech e Moley desenvolveram, em 1985, a versão do teste utilizando células binucleadas (MNCB), obtidas através do bloqueio da citocinese, que permite identificar células que tenham passado por um ciclo mitótico após o tratamento. Dessa forma,

podem-se identificar os micronúcleos gerados pela substância teste (aqueles presentes nas células binucleadas) e os originados antes do tratamento (aqueles presentes em células mononucleadas).

Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos. A presença de MN é analisada em eritrócitos policromáticos (PCE, eritrócitos jovens) de medula óssea de camundongos, mas pode, também, ser analisada em eritrócitos normocromáticos (NCE, eritrócitos maduros). Os animais são expostos à substância teste pela via mais adequada e sacrificados em tempos apropriados após o tratamento, para a coleta da medula óssea. As preparações celulares são coradas adequadamente (Giemsa ou Leishman) e analisadas para a presença de micronúcleos (RIBEIRO et al., 2010).

Para identificar o micronúcleo durante a análise, alguns aspectos referentes a ele devem ser observados, segundo Ferrari (1991), Titenko-Holland et al. (1997) e Fenech (2000):

- (1) Forma arredondada ou ovalada;
- (2) Cor e textura semelhantes à do núcleo principal;
- (3) Estar no mesmo plano e não estar ligado ao núcleo principal;
- (4) Tamanho entre 1/16 e 1/13 do tamanho do núcleo principal; e
- (5) Não ser birrefringente.

O teste de micronúcleo é de extrema relevância para a Toxicologia Genética e Ambiental, tendo em vista que detecta mutações cromossômicas; considerando que este tipo de dano é encontrado em células de pacientes com câncer, o teste de micronúcleo pode ser considerado um possível indicador de susceptibilidade para a carcinogênese (BONASSI et al., 2003; BONASSI et al., 2007). Dessa forma, os ensaios realizados com animais em laboratório oferecem grandes vantagens, especialmente de reproduzir as condições de exposições humanas aos agentes tóxicos (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

1.4. Considerações sobre *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.

A família Brassicaceae abrange, aproximadamente, 350 gêneros, divididos entre 13 tribos, contendo cerca de 3200 espécies (KOWALSKI et al., 1994; JOLY, 1998). *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C., pertence a esta família e é conhecida popularmente no Brasil como couve (LIMA et al., 2007).

Esta espécie botânica é amplamente utilizada na alimentação em muitos países, sobretudo no Brasil, onde está sempre presente nos pratos dos brasileiros, inclusive como acompanhamento da feijoada, prato típico nacional. Além disso, *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. é utilizada na medicina popular, especialmente no que diz respeito ao combate de doenças do trato gastrointestinal.

Existem muitos relatos no Brasil indicando que o suco preparado das folhas de *Brassica oleracea* na medicina tradicional, e também ingerida durante a alimentação, proporciona um alívio nos sintomas da úlcera gástrica e também com ação em outras doenças, como diabetes mellitus, cirrose e reumatismo (MOREIRA et al., 2002; MIRON et al., 2006; SILVA et al., 2006; LIMA et al., 2007; SANTOS e LIMA, 2008). Alguns estudos também têm demonstrado a relação entre compostos presentes nas plantas do gênero *Brassica* e prevenção do câncer, principalmente o de mama (GERBER et al., 2003; PADILHA e PINHEIRO, 2004).

Muitos estudos têm sido conduzidos com as espécies da família Brassicaceae, demonstrando atividade antimicrobiana, contra bactérias Gram-positivas, e também forte atividade antioxidante (SOUSA et al., 2008). Estudos com *B. oleracea* apontam a presença de ácidos fenólicos, que demonstram atividades antifúngicas e antibacterianas (AYAZ et al., 2008). Esta planta também contém flavonóides, especialmente quercetina e kaempferol, principalmente na forma glicosídica. Os flavonóides são metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza e apresentam muitas atividades biológicas, incluindo potencial gastroprotetor (MARTIN et al., 1998).

Brassica oleracea foi a espécie escolhida para este estudo, devido às informações anteriores, que demonstram as principais aplicações e propriedades que indicam a grande importância desta espécie, e pela ausência de estudos relativos à toxicidade genética do extrato de *B. oleracea*. Assim, tornou-se imprescindível o estudo do comportamento deste extrato em ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, como Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo.

2. OBJETIVOS

Baseado no fato de que o gênero *Brassica* vem despertando no meio farmacêutico um crescente interesse em sua utilização, por possuírem princípios ativos com ação comprovada para várias doenças, sobretudo àquelas que comprometem o trato digestório, e pelo fato da inexistência de qualquer estudo avaliando a toxicidade genética de extratos deste gênero em células de eucariontes, o presente projeto foi elaborado visando:

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial genotóxico e antigenotóxico do extrato de *Brassica oleraceae* em diferentes células somáticas e células germinativas de camundongos *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o potencial genotóxico e antigenotóxico do extrato hidroalcoólico de *Brassica oleracea* em leucócitos, em células da medula óssea, em células hepáticas, células cerebrais e células germinativas de camundongos suíços albinos *in vivo*, com a utilização do *Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)* ou Ensaio Cometa.

Avaliar o potencial clastogênico/aneugênico e protetor do extrato hidroalcoólico de *Brassica oleracea* em células da medula óssea de camundongos suíços albinos *in vivo*, pelo Teste do Micronúcleo.

3. REFERÊNCIAS

- ALVES, D.L.; SILVA, C.R. Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Editora Atheneu. p.1-02, 2002.
- AQUINO, I. Efeito genotóxico da artemisinina e do artesunato em células de mamíferos. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biociências, UNESP. Botucatu, SP, Brasil. 2010.
- ARAÚJO, MM. Aplicação do método microbiológico DEFT/APC e do teste do cometa na detecção do tratamento com radiação ionizante de hortaliças minimamente processadas. **Tese de doutorado**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, SP, Brasil. 2008.
- BAGATINI, M.D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, p. 444-447, 2007.
- BAST, A.; CHANDLER, R.F.; CHOY, P.C.; DELMULLE, L.M.; GRUENWALD, J.; HALKES, S.B.A.; KELLER, K.; KOEMAN, J.H.; PETER, P.; PRZYREMBEL, H.; REE, E.M.; RENWICK, A.G.; VERMEER, I.T.M. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use . **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.12, p.195-211, 2002.
- BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y.P.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M. Effect of smoking habit in the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micronucleus Project. **Mutation Research**. v.543, p.155-166, 2003.
- BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. v.28, p.625-631, 2007.
- BRASIL (2004A). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004**. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.
- BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**. v.36, p. 357-364, 2006.
- CHOY, W.N. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assesment**. Marcel Dekker, Inc, New York: 2001.
- CNS – CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, **Resolução nº 251**, 07/08/1997. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso251.doc>. Acesso em: 12 nov. 07.
- COLLINS A. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**. v.26, p.249-261, 2004.

- COSTA, R.J. Avaliação *in vitro* do potencial mutagênico de *Bidens pilosa* Line (picão – preto) e de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) por meio de ensaio do cometa e teste de micronúcleo. **Dissertação de mestrado**. UEL. 2006.
- DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**. v. 402, p. 151-158, 1998.
- DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**. v. 591, p. 8-15, 2005.
- DURAND, R.E.; OLIVE, P.L. The comet assay: Alternatives for quantitative analyses. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v.379, p. 130-131, 1997.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**. v.455, p.81-95, 2000.
- FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**. v.428, p.271-283, 1999.
- FERRARI, I. Teste do Micronúcleo em Cultura Temporária de Linfócitos. In: 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**, p.123-140, 1991.
- FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.1, n.3, p. 337-340, 2008.
- FRANCY-GUILFORD, J. PEZZUTO, J.M. Mechanisms of Cancer Chemopreventive Agents: A Perspective. **Planta Medica**. v.74, p.1644-1650, 2008.
- HOMAR, J.C. Medicinas complementarias o alternativas? Un dilema para el sistema publico. **Atención primaria**. v.35, p. 389-391, 2005.
- JOKSIÉ, G.; PETROVIÉ, S.; ILIÉ, Z. Age-related changes in radiation-induced micronuclei among healthy adults. 2004. In: Flores, M.; Yamaguchi, M.U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**. v.1, n.3, p.337-340, 2008.
- KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v.363, p.89-96, 1996.
- 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**, 3: 103-115, 1995.
- LEWIN, B. (Ed) *Genes VII*. USA: Oxford University Press, 2000. In: NEGRAES, P. D. Mutagenicidade e Antimutagenicidade da Clorofilina – Uma avaliação do seu mecanismo de ação *in vitro*. **Dissertação de Mestrado**. UEL. Londrina: 2003.

- LIVIERO, L.; VON BORSTEL, R.C. The 4th International Conference on Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: a summary. **Mutation Research**. v.350, p.287-293, 1996.
- McGREGOR, J.T.; CASCIAO, D.; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**. v.455, p. 3-20, 2000.
- MEIRELES, J.R.C.; LOPES, M.A.; ALVES, N.N.; CERQUEIRA, E.M.M. Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.52, p.337-343, 2006.
- NOVIC, A.; SZILARD, L. Anti-mutagens. **Nature**. v.170, p. 926-927, 1952.
- NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. Ed. Guanabara Koogan, 6ª ed, 2006.
- OECD - **GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS**. DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (mnvit), 2007. Disponível em: < <http://www.oecd.org/dataoecd/38/58/39780112.doc>> Acesso em: 07 set. 2007.
- ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, p.291-298, 1984.
- PINTO, L.F.R.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: **Mutagênese Ambiental**, Capítulo 2, Ed. Ulbra, Canoas, 2003.
- PRESTON, R.J.; DEAN, B.J.; GALLOWAY, S.; HOLDEN, H.; McFEE, A.F.; SHELBY, M. Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. **Mutation Research**. v.189, p.157-165, 1987
- REIS, S.R.A.; SOARES, L.P.; ROCHA, D.; SETÚBAL, M.G. Avaliação da presença de micronúcleos em células esfoliadas da língua de indivíduos dependentes químicos de etanol através dos métodos de Feulgen e Papanicolau. **Revista Odonto Ciência**. v.19, n.46, p. 367-371, 2004.
- RESENDE, F.A. Estudo da atividade mutagênica e/ou antimutagênica da *Baccharis dracunculifolia* em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. **Dissertação de mestrado**. Universidade de Franca, Franca, SP, 2008.
- RIBEIRO, L.R.; Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. Editora da Ulbra. p.173-199, 2006.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; TAKAHASHI, C.S.; GRISÓLIA, C.C. Teste do micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo. SBMCTA. **Orientações básicas para a execução de testes de mutagenicidade para a proteção da saúde humana e do meio**

ambiente. Disponível em: <http://www.sbmcta.org.br/serie-documentos.pdf>. Acesso em: 15/12/2011.

SCCNFP – THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. Proposal for recommended mutagenicity/genotoxicity tests for the safety testing of cosmetic ingredients to be included in the annexes to Council Directive 76/768/EEC. **SCCNFP/0755/03**, notas do guia, 9/12/2003, 12p.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research.** v.31, p.9-15, 1975.

SINGH, N.P., *et al.* A simple technique for quantification or low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research.** v. 175, p. 184-191, 1988.

TICE, R.R. The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venitt S, editors. **Environmental mutagenesis.** Oxford: Bios Scientific Publishers. p 315–339, 1995.

TICE et al. 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.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A.M.; SMITH, M.T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleous assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research.** v.338, p.85-95, 1997.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L.L.; LHUGUENOT, J.C.; BON, A.M.L.; CHAGNON, M.C. 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.

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

VARELLA SD, POZETTI GL, VILEGAS W, VARANDA EA. Mutagenic activity of sweepings and pigments of a household-was factory assayed with *Salmonella typhimurium*. **Food and Chemical Toxicol.**, 42: 2029-2035, 2004.

ZAHA, A. (Coord.). **Biologia Molecular Básica.** Porto Alegre: Mercado Aberto, p.336, 1996. In: AQUINO, I. Efeito genotóxico da artemisinina e do artesunato em células de mamíferos. Dissertação de Mestrado. UNESP/IBB. 2010.

4. ARTIGO

Submetido ao *Journal of Ethnopharmacology*.

Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice

Álvaro Luiz Martini Gonçalves¹, Marivane Lemos², Rivaldo Niero², Sérgio Faloni de Andrade² and Edson Luis Maistro^{1,3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Biociências, Botucatu, São Paulo, Brazil.

²Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí, Santa Catarina, Brazil.

³ Universidade Estadual Paulista – UNESP – Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia. Marília, SP, Brazil. 17525-900.

***Correspondence to:** E. L. Maistro, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia. Av. Hygino Muzzi Filho, 737, Caixa Postal 181. Marília, SP, Brazil. 17525-900. E-mail address: edson.maistro@marilia.unesp.br

Tel: + 551434021324. Fax: + 551434021302.

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC has been extensively used in Brazilian traditional medicine to treat gastric ulcer.

Aim of the study: This study was conducted to evaluate the *in vivo* genotoxic and/or antigenotoxic potential of a *Brassica oleraceae* hydroalcoholic extract obtained from the leaves, in different cells of mice.

Materials and methods: Analyses were performed using the comet assay, on leukocytes (collected 4 and 24 hours after treatment), liver, brain, bone marrow and testicular cells (collected 24 hours after treatment), and using the micronucleus test (MN) in bone marrow cells. Eight groups of albino Swiss mice were treated (N = 6): control (C), positive control (Doxorubicin 80 mg/kg (DXR)), and six experimental groups, which received 500, 1000 and 2000 mg/kg of *B. oleraceae* extract alone by gavage, while a further three groups received these same doses plus DXR (80 mg/kg). We calculated the damage scores, and their averages were compared by ANOVA followed by the Tukey test for multiple comparisons.

Results: The results demonstrated that none of the tested doses of *B. oleraceae* extract showed genotoxic effects by the comet assay, or clastogenic effects by the MN test. On the other hand, for all cells evaluated, the three tested doses of the *Brassica* extract promoted inhibition of DNA damage induced by DXR.

Conclusions: Under our experimental conditions, *B. oleraceae* leaf extract showed no genotoxic or clastogenic effects in different cells of mice. However, it did show a significant decrease in DNA damage induced by doxorubicin. It is suggested that the antigenotoxic properties of this extract may be of great pharmacological importance, and may be beneficial for cancer prevention.

Keywords: *Brassica oleraceae*, Comet assay, Micronucleus test, antigenotoxic effects.

1. Introduction

The family Brassicaceae has approximately 350 genera, divided into 13 tribes, and has about 3200 species (Joly, 1998; Kowalski et al., 1994). *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C., which belongs to this family, is popularly known in Brazil as "couve" (Lima et al., 2007) and in English-speaking countries as "kale" (Joly, 1998). Several studies have been conducted with this species, showing antimicrobial activity against gram-positive bacteria, and strong antioxidant activity (Sousa et al., 2008). There are several Brazilian reports indicating that the juice prepared by the leaves of *Brassica oleracea* in traditional medicine, and ingested during fasting, brings relief of symptoms of gastric ulcers and also some other diseases such as diabetes mellitus, cirrhosis and rheumatism (Lima et al., 2007; Miron et al., 2006; Moreira et al., 2002; Santos and Lima, 2008; Silva et al., 2006). Also, a quick Internet search using the terms "úlceras" (Portuguese for ulcer) and "couve" found more than 35,000 websites relating to the popular uses of this vegetable for the treatment of gastric ulcers. Moreover, in an ethnopharmacological study conducted by Silva et al. (2006), it was found that *Brassica oleracea* is the plant that is most commonly used by the Brazilian population to treat gastritis and gastric ulcers. Some studies also have shown a relationship between the compounds present in plants of the genus *Brassica* and the prevention of cancer (Gerber et al., 2003; Padilha and Pinheiro, 2004).

Other studies on *B. oleraceae* point to the presence of phenolic acids, which showed antifungal and antibacterial activity (Ayaz et al., 2008). This plant also contains some flavonoids, especially quercetin and kaempferol, mainly in glycosidic form. Flavonoids are secondary metabolites that are widely distributed in nature and have several biological activities, including gastroprotector potential (Martin et al., 1998).

Akhtar and Munir (1989) evaluated the powder obtained from dried leaves of *Brassica oleracea* in the aspirin-induced ulcer model. In this study, an increase in gastric protection was observed. However, the authors used only one model to evaluate the antiulcer activity, without

studying some other models that could enable a better understanding of the gastroprotective mechanisms.

To our knowledge, this is the first study that has investigated the possible genetic toxicity and/or DNA damage protection effects of *Brassica oleraceae* extract. It therefore sought to evaluate the genotoxic and antigenotoxic activity of the hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea*, in different cells of mice *in vivo*, using the comet and micronucleus assays.

2. Material and Methods

2.1 Plant material

The leaves of *Brassica oleracea* were collected in Rio das Antas, in the State of Santa Catarina, Brazil, in September 2008 (Latitude 26°57'31.96" N, longitude 51°0'23.76" W) and identified by Dr. Amaury Antônio Silva Junior. A voucher specimen was deposited at the Barbosa Rodrigues Herbarium (Itajaí, SC) under number 52747. Air-dried material (700 g) was cut into small pieces and macerated with aqueous ethanol mixture 50% (v/v) at room temperature for 10 days. The macerate was filtered and the solvent removed by rotatory evaporator under reduced pressure, yielding 306.47 g (43.78%) of crude hydroalcoholic extract.

2.2 Preliminary phytochemical analysis of extract

Thin layer chromatography (TLC) was used to evaluate the chemical composition of *Brassica oleracea* extract. The following solvent system was used: hexane:ethyl acetate (7:3) and

chloroform:methanol (7:3) and revealed with reagents specific chromophores, anisaldehyde for terpenoids, and ferric chloride for phenolic compounds. Different standards of terpenes and flavonoid solutions were used for the purposes of comparison.

2.3 Animals and dosing

Experiments were carried out on 10-week-old male Swiss albino mice (*Mus musculus*), weighing 25-30 g. The animals were acquired from the animal house of the Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo state, Brazil, and kept in polyethylene boxes, in a climate-controlled environment ($25 \pm 4^{\circ}\text{C}$, $55 \pm 5\%$ relative humidity) with a 12-h light/dark cycle (7:00 am to 7:00 pm). Food (NUVILAB CR1 - NUVITAL) and water were available *ad libitum*. The mice were divided into 8 experimental groups of 6 animals each. Considering the small size of the animals and the vehicle (distilled water) the *Brassica oleraceae* extract was administered in a single dose of 0.5 mL by gavage, at doses of 500, 1000 and 2000 mg/kg body weight, chosen on the basis of our acute toxicity studies in mice, which was higher than 2000 mg/kg, and following the limit dose recommended by OECD 420 for acute treatments in toxicology assays. The simultaneous treatment was carried out with the three doses of the extract plus doxorubicin (DXR) after one hour treatment. The negative control group received distilled water by gavage. The positive control group received an intraperitoneal injection of DXR 80 mg/kg. The animals used in this study were sacrificed by cervical dislocation without anesthesia, to avoid possible alterations in the DNA damage analysis. The Animal Bioethics Committee of the Faculdade de Medicina de Marília, CEP/FAMEMA, Marília, Brazil, approved the present study on March 29, 2010 (protocol number 084/10), in accordance with Brazilian regulations on animal care (CONEP Regulatory Resolution 04/97).

2.4 Comet Assay

The comet assay (SCGE) was carried out by the method described by Speit and Hartmann (1999), which is based on the original work of Singh et al. (1996) and includes modifications introduced by Klaude et al. (1996) as well as additional modifications. Peripheral blood samples from the tail vein were obtained from six Swiss mice of each group, at 4 and 24 h after treatment and before euthanasia. After sacrifice of the animals, liver, bone marrow, brain and testicle cells samples were washed in saline solution, in an ice bath. A small portion (diameter of about 4 millimeters) was transferred to a Petri dish containing 1mL of Hank's solution (pH 7.5) and then homogenized gently with a small pair of tweezers and a syringe to remove any clumps of cells. An aliquot of 20 μ L was removed from the supernatant of each cell type to determine cell viability. Cell counting was performed using a hemocytometer. Cell viability was determined by trypan blue dye exclusion. The number of trypan blue-negative cells was considered the number of viable cells and was greater than 85%. Another equal aliquot of cells from each animal was mixed with 120 μ L of 0.5% low melting point agarose at 37°C, and rapidly spread onto two microscope slides per animal, pre-coated with 1.5% normal melting point agarose. The slides were coverslipped and allowed to gel at 4°C for 20 min. The coverslips were gently removed and the slides were then immersed in cold, freshly prepared lysing solution consisting of 89 mL of a stock solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH set to 10.0 with ~8 g solid NaOH, 890 mL of distilled water and 1% sodium lauryl sarcosine), plus 1 mL of Triton X-100 (Merck) and 10 mL of dimethyl sulfoxide (Merck). The slides, which were protected from light, were allowed to stand at 4°C for 1 h and then placed in the gel box, positioned at the anode end, and left in a high pH (>13) electrophoresis buffer (300 mM NaOH-1 mM EDTA, prepared from a stock solution of 10 N NaOH and 200 mM, pH 10.0, EDTA) at 4°C for 20 min prior to electrophoresis, to allow DNA unwinding. The electrophoresis run was carried out in an ice bath (4°C) for 20 min at 300 mA and 25 V (0.722 V cm^{-1}). The slides were then submerged in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl,

pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature and fixed in 100% ethanol for 10 min. The slides were dried and stored overnight or longer, before staining. For the staining process, the slides were briefly rinsed in distilled water, covered with 30 μ L of 1x ethidium bromide staining solution prepared from a 10x stock (200 μ g/ml) and coverslipped. The material was evaluated immediately at 400x magnification, using a fluorescence microscope (Olympus BX 50) with a 515-560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter. Only individual nucleoids were scored.

The extent and distribution of DNA damage indicated by the SCGE assay was evaluated by examining at least 100 randomly selected and non-overlapping cells (50 cells per coded slide) per animal in a blind analysis (six mice per group). These cells were scored visually, according to tail size, into the following four classes: class 0- no tail; class 1- tail shorter than the diameter of the head (nucleus); class 2- tail length 1 to 2 times the diameter of the head; and class 3- tail length more than twice the diameter of the head. Comets with no heads, with nearly all of the DNA in the tail or with a very wide tail being excluded from the evaluation because they probably represented dead cells (Hartmann and Speit, 1997). The total score for 100 comets, which ranged from 0 (all undamaged) to 300 (all maximally damaged), was obtained by multiplying the number of cells in each class by the damage class.

2.5 Micronucleus Test

The assay was carried out following standard protocols as recommended by Schmid (1976) and Krishna and Hayashi (2000). The same six male mice per group as those used in the comet assay were also used to this protocol. The bone marrow from one femur was flushed out using 2 mL of saline (0.9% NaCl) and centrifuged for 7 min. The supernatant was discarded and smears were made on slides. The slides were coded for a “blind” analysis, fixed with methanol and stained with Giemsa (Gollapudi and Kamra, 1979). For the analysis of the micronucleated cells,

two thousand polychromatic erythrocytes (PCE) per animal were scored to determine the clastogenic property of the extract. To detect possible cytotoxic effects, the PCE/NCE (normochromatic erythrocytes) ratio in 200 erythrocytes/animal was calculated (Gollapudi and McFadden, 1995). The cells were blindly scored using a light microscope at 1000x magnification. The mean number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in individual mice was used as the experimental unit, with variability (standard deviation) based on differences among animals within the same group.

2.6 Percentage reduction

The percentage reduction of genotoxic agent-induced damage by *Brassica oleracea* hydroalcoholic extract was calculated according to Waters *et al.* (1990), using the following formula:

$$\% \text{ Reduction} = \frac{A-B}{A-C} \times 100$$

where *A* corresponds to the score or MNPCE mean observed in the treatment with DXR (positive control), *B* corresponds to score or MNPCE mean observed in the antigenotoxic treatment (extract plus DXR) and *C* corresponds to the score or MNPCE mean in the control.

2.7 Statistical analysis

After verifying for normal distribution (normality test KS performed using GraphPad Instat[®] software), the data obtained from the comet assay were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the Tukey-Kramer multiple comparison test, and the data obtained from the micronucleus assay were submitted to the analysis of variance test (ANOVA) with linear regression, both using the GraphPad Instat[®] software (version 3.01). The results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

Phytochemical analysis of *B. oleracea* hydroalcoholic extract evidenced that flavonoids, terpenes and sterols are the main compounds. The presence of these compounds class was confirmed by Co-TLC using reference standards (quercetin, α , β -amyrin, stigmasterol and lupeol) and anisaldehyde sulfuric and FeCl_3 as developer. The presence of other terpenoids and steroids was also observed.

Brassica oleracea L. var. *acephala* D.C. is a botanical species that is widely used as a food and in therapeutic popular, especially combating diseases of the gastrointestinal tract. In order to contribute to the evaluation of health risks due to the medicinal use of *Brassica oleraceae* extract, this study analyzed the genotoxic and antigenotoxic activities of the leaves hydroalcoholic extract of this plant *in vivo*, using the comet assay and the micronucleus test.

The alkaline version of the comet assay detects a broad spectrum of DNA lesions, including breakage of single-stranded and double-stranded DNA (Brendler-Schwaab et al., 2005), and has been shown to be a sensitive method for the detection of genomic damage induced by different genotoxic agents (Tice et al., 2000).

In the comet assay, *B. oleracea* hydroalcoholic extract did not induce DNA strand breaks at the tested doses, with no significant difference in the mean scores obtained, when compared

with those obtained for the control (Table 1), demonstrating the absence of genotoxic effects. As expected, the animals treated with DXR exhibited a higher DNA damage index ($p < 0.001$) compared to the control group. Simultaneous treatment showed a significant reduction in the extent of DNA damage for all cell types exposed to the three doses (500, 1000 and 2000 mg/kg) of the extract plus DXR, compared with the DXR-treated group alone (Table 2). In all the cell types analyzed, the percentage of reductions were higher than 80%, showing a potent chemopreventive effect of the *Brassica* extract. However, the increase in dose of the extract did not result in a proportional reduction in genotoxicity induced by doxorubicin, indicating the lack of a dose-response relationship.

The micronucleus test is a cytogenetic test which consists in detecting possible chromosomal aberrations in cells previously exposed to chemical agents. It is based on the evaluation of an increase in the frequency of polychromatic erythrocytes with micronuclei (Flores and Yamaguchi, 2008). In our study, using the micronucleus test, the results of clastogenic and anticlastogenic analysis obtained for the treatments are provided in Table 3. There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes between the control and the groups treated with the three doses of *B. oleraceae* hydroalcoholic extract alone, indicating an absence of clastogenic/aneugenic effects of this extract. As expected, animals treated with doxorubicin showed a high frequency of MNPCE in bone marrow cells when compared to the control ($p < 0.001$). In addition, oral administration of different doses of *B. oleraceae* extract followed with the injection of doxorubicin led to a significant reduction in the frequency of MNPCE when compared with the group treated only with doxorubicin. This reduction ranged from 71.46% to 80.03% in the micronucleus test (Table 3) and indicated a potent chemoprevention of the extract against the mutagenic effects of doxorubicin. The gradual increase in dose of *Brassica* extract dose result in a proportional increase in the reduction in clastogenicity induced by doxorubicin. The mean of the PCE/NCE ratio and standard deviation are also shown in Table 3. No significant reduction in the mean number of PCE in total

erythrocytes, in comparison with the control, was observed in any of the treatment groups, which demonstrates the absence of cytotoxicity of the different treatments under the conditions tested.

Our literature review showed that there are no previous studies involving the evaluation of the genotoxic or antigenotoxic potential of the *B. oleraceae* extracts. Nevertheless, our phytochemical characterization of the extract, as also observed in previous studies, showed that *B. oleraceae* extract contains some flavonoids, especially quercetin and kaempferol, as well as terpenes, sterols and glucosionolates, in its constitution, and for some of these compounds, there are genotoxic studies. Ngomuo and Jones (1996) observed that quercetin was not genotoxic when administered *in vivo* in mice. Bakheet (2011, in press) reported that quercetin is not genotoxic and has a protective effect against topotecan-induced cyto and genotoxicity in the bone marrow cells of mice. Additionally, Lin et al. (2009) observed that both compounds found in the extract studied in our present study, quercetin and kaempferol, were not mutagenic in their *in vitro* and *in vivo* analysis. On the other hand, Mazumdar et al. (2011) demonstrated that quercetin administered orally was not genotoxic, but when administered by the intraperitoneal route, it showed genotoxic effects.

In the present study we observed the absence of genotoxicity of the *B. oleraceae* extract. On the other hand however, we observed that this extract presented protective effects in acute treatment (24 h) against doxorubicin-induced DNA damage. Our results are in agreement with the above mentioned studies that analyze some of the main compounds found in the *B. oleraceae* extract.

Some studies indicate that compounds present in plants from the Brassicaceae family, such as indole-3-carbinol (Gerber et al., 2003) and the isotiocianates, are related to the prevention of breast cancer in women who consume a diet rich in vegetables of this botanical family. According to Padilha and Pinheiro (2004), as a general rule, these compounds act by inhibiting the oxidative metabolism of several carcinogens, which leads to DNA damage. Doxorubicin (DXR), used in our study as a DNA damage agent, is an anthracycline with anticancer activity. In addition to several

classes of antineoplastic agents, this drug generates high levels of oxidative stress in biological tissues, although the generation of free radicals does not play a significant role in the antineoplastic activity of DXR (Conklin, 2004). Based the present study, although the exact mechanism through which the *B. oleraceae* extract promoted the inhibition of genotoxicity induced by DXR is not completely understood, we can hypothesize that the antioxidant compounds present in the extract may explain the protective effects observed in this study.

In conclusion, under the experimental conditions used in the present study, we observed by the comet assay that *Brassica oleraceae* leaf extract, administered by gavage, is not genotoxic in leukocytes, bone marrow, liver, brain and testicular cells of mice, and by the micronucleus test, that it is not genotoxic in bone marrow cells either. Additionally, this tested extract presented chemopreventive effect, inhibiting the genotoxicity induced by the antitumoral agent DXR, in all the evaluated cells. Although further investigations are needed to clarify the protective role of the *B. oleraceae* extract, it is suggested that antigenotoxic properties of this extract are of great pharmacological importance, and might be beneficial for cancer prevention.

Acknowledgements

Research supported by the FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2010/07577-3), Brazil. A.L.M. Gonçalves thanks CAPES for the Master's degree scholarship.

References

- Akhtar, M.S., Munir, M., 1989. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea* and *Ocimum basilicum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 27, 163-176.

- Ayaz, F.A., Hayrloglu-Ayaza, S., Alpay-Karaoglu, S., Grúz, J., Valentová, C., Ulrichová, J., Strnad, M., 2008. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*. 107, 19-25.
- Bakheet, S.A., 2011 in press. Assessment of anti-cytogenotoxic effects of quercetin in animals treated with topotecan. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., Speit, G., 2005. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 20, 245–254.
- CONEP Regulatory Resolution 04/97. <http://www.ufrrs.br/bioetica/res497hc.htm> Accessed on march, 3/2011.
- Conklin, K.A., 2004. Cancer chemotherapy and antioxidants. *Journal of Nutrition*. 134, 3201–3204.
- Flores, M., Yamaguchi, M.U., 2008. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. *Revista Saúde e Pesquisa*. 01, 337-340.
- Gerber, B., Müller, H., Reimer, T., Krause, A., Friese, K., 2003. Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Research Treatments*. 79, 265-276
- Gollapudi, B., Kamra, O.P., 1979. Application of a simple giemsa-staining method in the micronucleus test. *Mutation Research*. 64, 45-46.
- Gollapudi, B.B., McFadden L.G., 1995. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*. 347, 97-99.
- Hartmann, A., Speit, G., 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA - effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters*. 90, 183-188.

- Joly, A.B., 1998. Botânica – Introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 100-104.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnstrom, G., 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*. 363, 89-96.
- Kowalsky, S.P., Lan, T.H., Feldmann, K.A., Paterson, A. H., 1994. Comparative mapping of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*. *Genetics Society of America*. 138, 499-510.
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*. 455, 155-166.
- Lima, C.B., Bellettini, N.M.T., Silva, A.S., Cheirubim, A.P., Janani, J.K., Vieira, M.A.V., Amador, T.S., 2007. Uso de plantas medicinais pela população da zona urbana de Bandeirantes-PR. *Revista Brasileira de Bociências*. 5, 600-602.
- Lin, M.C., Cheng, H.W., Tsai, Y.C., Liao, P.L., Kang, J.J., Cheng, Y.W., 2009. Podophyllin, but not the constituents quercetin or kaempferol, induced genotoxicity *in vitro* and *in vivo* through ROS production. *Drug and Chemical Toxicology*. 32, 68-76.
- Martin, M.J., La-Casa, C., Alarcon-de-Lastra, C., Cabeza, J., Villegas, I., Moltiva, V., 1998. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 52, 82-88.
- Mazumdar, M., Giri, S., Giri, A., 2011. Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: analysis of micronucleus and chromosome aberrations *in vivo*. *Mutation Research*. 721, 147-152.
- Miron, A., Hancianu, M., Aprotosoia A.C., Gacea, O., Stanescu, U., 2006. Contributions to chemical study of the raw polysaccharide isolated from the fresh pressed juice of white cabbage leaves. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*. 110, 1020-1026.

- Moreira, R.C.T., Costa, L.C.B., Costa, R.C.S., Rocha, E.A., 2002. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. *Acta Farmacêutica Bonaerense*. 21, 205-211.
- Ngomuo, A.J., Jones, R.S., 1996. Genotoxicity studies of quercetin and shikimate in vivo in the bone marrow of mice and gastric mucosal cells of rats. *Veterinary and Human Toxicology*. 38, 176-180.
- OECD, 2001. Guideline for Testing of Chemicals. Guidance No. 420. Fixed Dose Procedure, Adopted December 17, 2001. Disponible in http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL420.pdf.
- Padilha, P.C., Pinheiro, R.L., 2004. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 50, 251-260.
- Santos, M.R.A., Lima, M.R., 2008. Levantamento dos recursos vegetais utilizados como fitoterápicos no município de Cujubim, Rondônia, Brasil. *Saber Científico*. 01, 58-74.
- Schmid, W., 1976. The micronucleous test. *Mutation Research*. 31, 9-15.
- Silva, M.S., Antonioli, A.R., Batista, J.S., Mota, C.N., 2006. Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 20, 815-829.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1996. A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175, 184-191.
- Sousa, C., Taveira, M., Valentão, P., Fernandes, F., Pereira, J.A., Estevinho, L., Bento, A., Ferreres, F., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2008. Inflorescences of Brassicacea species as source of bioactive compounds: a comparative study. *Food Chemistry*. 110, 953-961.

- Speit, G., Hartmann, A., 1999. The comet assay (single-cell gel test), in: Henderson, D.S. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 113, DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 203-212.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35, 206-221.
- Waters, M.D., Brady, A.L., Stack, H.F., Brockman, H.E., 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research*. 238, 57-85.

Table 1. – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Brassica oleracea* extract in different cells of male Swiss mice *in vivo*. (Mean $\pm$ SD).

Treatments and		Comet class				Scores
cells analysed	Total ¹	0	1	2	3	
Peripheral blood (4h sample)						
Control	1.16 ± 0.98	98.83 ± 0.98	1.16 ± 0.98	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.16 ± 0.98
BOE 500 mg/kg	4.83 ± 1.94	95.16 ± 1.94	4.33 ± 1.75	0.50 ± 0.83	0.00 ± 0.00	5.33 ± 2.42
BOE 1000 mg/kg	4.83 ± 2.23	95.16 ± 2.22	4.00 ± 2.53	0.83 ± 0.75	0.00 ± 0.00	5.66 ± 2.16
BOE 2000 mg/kg	6.50 ± 3.27	93.50 ± 3.27	6.00 ± 2.53	0.50 ± 0.83	0.00 ± 0.00	7.00 ± 4.05
Doxorubicin 80 mg/kg	29.50 ^a ± 7.89	70.50 ^a ± 7.89	25.16 ^a ± 7.05	3.16 ± 1.47	1.16 ± 0.40	35.00 ^a ± 8.99
Peripheral blood (24h sample)						
Control	2.50 ± 1.64	97.50 ± 1.64	2.50 ± 1.64	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.50 ± 1.64
BOE 500 mg/kg	4.66 ± 3.07	95.33 ± 3.07	4.66 ± 3.07	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.50 ± 3.02
BOE 1000 mg/kg	6.16 ± 1.94	93.83 ± 1.94	5.33 ± 1.63	0.83 ± 0.75	0.00± 0.00	7.00 ± 2.45
BOE 2000 mg/kg	5.66 ± 2.94	94.33 ± 2.94	4.66 ± 2.80	0.83 ± 0.75	0.16 ± 0.40	6.83 ± 3.37
Doxorubicin 80 mg/kg	84.00 ^a ± 5.58	16.00 ^a ± 5.58	75.66 ^a ± 4.41	7.16 ^a ± 4.49	1.16 ± 0.40	93.50 ^a ± 9.81
Liver						
Control	22.83 ± 9.28	77.16 ± 9.28	19.33 ± 10.32	3.50 ± 2.74	0.00 ± 0.00	26.33 ± 8.98
BOE 500 mg/kg	17.83 ± 3.92	82.16 ± 3.92	17.50 ± 3.62	0.33 ± 0.51	0.00 ± 0.00	18.16 ± 4.26
BOE 1000 mg/kg	11.33 ± 4.45	88.66 ± 4.45	10.50 ± 3.73	0.83 ± 0.98	0.00 ± 0.00	12.16 ± 5.27
BOE 2000 mg/kg	33.33 ± 8.89	66.66 ± 8.89	28.66 ± 9.22	4.66 ± 3.20	0.00 ± 0.00	38.00 ± 9.67
Doxorubicin 80 mg/kg	92.66 ^a ± 2.25	7.33 ^a ± 2.25	44.33 ^a ± 14.13	43.33 ^a ± 3.17	5.00 ± 4.65	146.0 ^a ± 21.42
Bone marrow						
Control	3.00 ± 2.09	97.00 ± 2.10	3.00 ± 2.10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.00 ± 2.10
BOE 500 mg/kg	5.16 ± 2.48	94.83 ± 2.48	5.16 ± 2.48	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5.16 ± 2.48
BOE 1000 mg/kg	5.16 ± 2.64	94.83 ± 2.64	4.66 ± 2.16	0.50 ± 0.83	0.00 ± 0.00	5.66 ± 3.27
BOE 2000 mg/kg	4.66 ± 4.08	95.33 ± 4.08	4.66 ± 4.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.66 ± 4.08
Doxorubicin 80 mg/kg	81.83 ^a ± 7.83	18.16 ^a ± 7.83	51.33 ^a ± 13.32	27.66 ^a ± 15.08	2.83 ± 2.56	115.2 ^a ± 25.05
Brain						
Control	12.16 ± 2.13	87.83 ± 2.13	12.16 ± 2.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	12.16 ± 2.14
BOE 500 mg/kg	15.83 ± 2.86	84.16 ± 2.85	15.83 ± 2.85	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	15.83 ± 2.86
BOE 1000 mg/kg	11.16 ± 2.71	88.83 ± 2.71	10.83 ± 2.40	0.33 ± 0.51	0.00 ± 0.00	11.50 ± 3.08
BOE 2000 mg/kg	7.83 ± 3.76	92.16 ± 3.76	7.83 ± 3.76	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	7.83 ± 3.76
Doxorubicin 80 mg/kg	83.66 ^a ± 10.34	16.33 ^a ± 10.34	38.83 ^a ± 14.69	39.16 ^a ± 4.13	5.66 ± 5.20	134.2 ^a ± 30.23
Testicle						
Control	4.50 ± 2.26	95.50 ± 2.26	4.50 ± 2.26	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.50 ± 2.26
BOE 500 mg/kg	9.66 ± 3.26	90.33 ± 3.26	9.66 ± 3.26	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	9.66 ± 3.26
BOE 1000 mg/kg	8.16 ± 3.54	91.83 ± 3.54	7.83 ± 2.78	0.33 ± 0.81	0.00 ± 0.00	8.50 ± 4.32
BOE 2000 mg/kg	6.00 ± 1.41	94.00 ± 1.41	5.83 ± 1.17	0.16 ± 0.41	0.00 ± 0.00	6.16 ± 1.72
Doxorubicin 80 mg/kg	68.00 ^a ± 8.67	32.00 ^a ± 8.67	44.66 ^a ± 10.93	22.16 ^a ± 11.30	1.16 ± 1.47	92.50 ^a ± 17.05

^a Significantly different from the negative control (P<0.001); ¹Total number of damaged cells (class 1+2+3); BOE: *Brassica oleracea* extract.

Table 2. – DNA migration in the comet assay for the assessment of antigenotoxicity of *Brassica oleracea* extract in different cells of male Swiss mice *in vivo*. (Mean $\pm$ SD).

Treatments and		Comet class				Scores	Reduction
cells analysed	Total ¹	0	1	2	3		(%)
Peripheral blood (4h sample)							
Control	1.16 ^a ± 0.98	98.83 ^a ± 0.98	1.16 ^a ± 0.98	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.16 ^a ± 0.98	-----
BO E500 mg/kg+ DXR 80mg/kg	6.66 ^a ±4.84	93.33 ^a ± 4.84	6.50 ^a ± 4.85	0.16 ± 0.41	0.00 ± 0.00	6.83 ^a ±4.87	83.24
BO E1000 mg/kg+DXR 80mg/kg	3.66 ^a ±1.63	96.33 ^a ± 1.63	3.50 ^a ± 1.64	0.16 ± 0.41	0.00 ± 0.00	3.83 ^a ±1.72	92.11
BO E2000 mg/kg+DXR 80mg/kg	8.16 ^a ±6.82	91.83 ± 6.82	7.83 ± 6.40	0.33 ± 0.81	0.00 ± 0.00	8.50 ^a ±7.31	78.31
Doxorubicin (DXR) 80 mg/kg	29.50 ± 7.89	70.50 ± 7.89	25.16 ± 7.05	3.16 ± 1.47	1.16 ± 0.40	35.00 ± 8.99	-----
Peripheral blood (24h sample)							
Control	2.50 ^a ± 1.64	97.50 ^a ± 1.64	2.50 ^a ± 1.64	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.50 ^a ± 1.64	-----
BO E500 mg/kg+ DXR 80mg/kg	7.83 ^a ±6.18	92.16 ^a ± 6.18	6.83 ^a ± 5.34	1.00 ± 0.89	0.00 ± 0.00	8.83 ^a ±7.02	93.04
BO E1000 mg/kg+DXR 80mg/kg	7.66 ^a ±6.09	92.33 ^a ± 6.08	7.00 ^a ± 5.44	0.66 ± 1.21	0.00± 0.00	8.33 ^a ±6.89	93.59
BO E2000 mg/kg+DXR 80mg/kg	10.16 ^a ±6.18	89.83 ^a ± 6.18	9.50 ^a ± 5.92	0.66 ± 0.81	0.00 ± 0.00	10.83 ^a ±6.52	90.85
Doxorubicin (DXR) 80 mg/kg	84.00 ± 5.58	16.00 ± 5.58	75.66 ± 4.41	7.16 ± 4.49	1.16 ± 0.40	93.50 ± 9.81	-----
Liver							
Control	22.83 ^a ±9.28	77.16 ^a ± 9.28	19.33 ^a ± 10.32	3.50 ^a ± 2.74	0.00 ± 0.00	26.33 ^a ±8.98	-----
BO E500 mg/kg+ DXR 80mg/kg	33.83 ^a ±6.24	66.16 ^a ± 6.24	33.33 ^b ± 5.85	0.50 ^a ± 0.54	0.00 ± 0.00	34.33 ^a ±6.65	93.31
BO E1000 mg/kg+DXR 80mg/kg	31.50 ^a ±6.02	68.50 ^a ± 6.02	28.83 ^a ± 4.62	2.33 ^a ± 1.63	0.33 ± 0.51	34.50 ^a ±7.92	93.17
BO E2000 mg/kg+DXR 80mg/kg	44.16 ^a ±4.53	55.83 ^{a d} ± 4.53	40.33 ^d ± 2.58	3.83 ^a ± 2.23	0.00 ± 0.00	48.00 ^a ±6.66	81.89
Doxorubicin (DXR) 80 mg/kg	92.66 ± 2.25	7.33 ± 2.25	44.33 ± 14.13	43.33 ±13.17	5.00 ± 4.65	146.0±21.42	-----
Bone marrow							
Control	3.00 ^a ± 2.09	97.00 ^a ± 2.10	3.00 ^a ± 2.10	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.00 ^a ± 2.10	-----
BO E500 mg/kg+ DXR 80mg/kg	10.83 ^a ±4.07	89.16 ^a ± 4.07	10.33 ^a ± 3.93	0.50 ^a ± 0.54	0.00 ± 0.00	11.33 ^a ±4.27	92.57
BO E1000 mg/kg+DXR 80mg/kg	12.33 ^a ±3.14	87.66 ^a ± 3.14	12.00 ^a ± 3.34	0.33 ^a ± 0.51	0.00 ± 0.00	12.66 ^a ±3.01	91.39
BO E2000 mg/kg+DXR 80mg/kg	20.66 ^a ±7.00	79.33 ^{a d} ± 7.00	16.50 ^b ± 7.26	3.83 ^a ± 2.56	0.33 ± 0.81	25.16 ^a ±7.96	80.24
Doxorubicin (DXR) 80 mg/kg	81.83 ± 7.83	18.16 ± 7.83	51.33 ± 13.32	27.66 ±15.08	2.83 ± 2.56	115.2±25.05	-----
Brain							
Control	12.16 ^a ±2.13	87.83 ^a ± 2.13	12.16 ^a ± 2.13	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ± 0.00	12.16 ^a ±2.14	-----
BO E500 mg/kg+ DXR 80mg/kg	30.16 ^a ±10.48	69.83 ^{a c} ±10.47	25.16 ± 5.94	4.83 ^a ± 6.50	0.16 ± 0.40	35.33 ^a ±16.8	81.01
BO E1000 mg/kg+DXR 80mg/kg	18.33 ^a ±10.80	81.66 ^a ± 10.80	14.50 ^a ± 6.41	3.66 ^a ± 5.20	0.16 ± 0.40	22.33 ^a ±15.6	91.66
BO E2000 mg/kg+DXR 80mg/kg	13.83 ^a ±2.40	86.16 ^a ± 2.40	13.83 ^a ± 2.40	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ± 0.00	13.83 ^a ±2.40	98.63
Doxorubicin (DXR) 80 mg/kg	83.66 ±10.34	16.33 ± 10.34	38.83 ± 14.69	39.16 ±14.13	5.66 ± 5.20	134.2±30.23	-----
Testicle							
Control	4.50 ^a ± 2.26	95.50 ^a ± 2.26	4.50 ^a ± 2.26	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.50 ^a ± 2.26	-----
BO E500 mg/kg+ DXR 80mg/kg	13.83 ^a ±3.97	86.16 ^a ± 3.97	13.16 ^a ± 3.43	0.66 ^a ± 0.81	0.00 ± 0.00	14.5 ^a ±4.60	88.64
BO E1000 mg/kg+DXR 80mg/kg	16.50 ^a ±1.87	83.50 ^{a c} ± 1.87	13.83 ^a ± 3.25	2.66 ^a ± 1.86	0.00 ± 0.00	19.16 ^a ±1.83	83.34
BO E2000 mg/kg+DXR 80mg/kg	6.66 ^a ±3.01	93.33 ^a ± 3.01	6.33 ^a ± 3.56	0.33 ^a ± 0.81	0.00 ± 0.00	7.00 ^a ±2.61	97.16
Doxorubicin (DXR) 80 mg/kg	68.00 ± 8.67	32.00 ± 8.67	44.66 ± 10.93	22.16 ±11.30	1.16 ± 1.47	92.50±17.05	-----

^a Significantly different from the Doxorubicin control ($p < 0.001$); ^b Significantly different from the negative control ($P < 0.05$); ^c Significantly different from negative control ($P < 0.01$); ^d Significantly different from negative control ($P < 0.001$); ¹Total number of damaged cells (class 1+2+3); BOE: *Brassica oleracea* extract; DXR: Doxorubicin.

Table 3 – Number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) observed in the bone marrow cells of male (M) Swiss mice treated with *Brassica oleracea* extract, and respective controls. Two thousand cells were analyzed. SDM = standard deviation from the mean.

Treatments	Number of MNPCE per Animal						MNPCE	PCE/NCE	Reduction (%)
							Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆			
Control	1	0	0	0	1	0	0.33 $\pm$ 0.51	1.07 $\pm$ 0.05	-----
(Water)									
<i>Brassica oleracea</i> extract (500 mg/kg)	0	1	1	0	1	0	0.50 $\pm$ 0.54^a	1.17 $\pm$ 0.06	-----
<i>Brassica oleracea</i> extract (1000 mg/kg)	1	0	1	0	0	1	0.50 $\pm$ 0.54^a	1.16 $\pm$ 0.08	-----
<i>Brassica oleracea</i> extract (2000 mg/kg)	1	1	0	1	0	1	0.66 $\pm$ 0.51^a	1.18 $\pm$ 0.09	-----
BOE (500 mg/kg) + DXR (80 mg/kg)	4	3	4	4	3	4	3.66 $\pm$ 0.51^{a,b}	1.22 $\pm$ 0.05	71.46
BOE (1000 mg/kg) + DXR (80 mg/kg)	3	4	2	4	3	4	3.33 $\pm$ 0.81^{a,b}	1.15 $\pm$ 0.07	74.29
BOE (2000 mg/kg) + DXR (80 mg/kg)	3	3	3	2	3	2	2.66 $\pm$ 0.51^{a,b}	1.23 $\pm$ 0.11	80.03
Doxorubicin (DXR) (80 mg/kg)	11	13	12	12	13	11	12.00 $\pm$ 0.89^b	1.18 $\pm$ 0.09	-----

^a Significantly different from Doxorubicin control ($p < 0.001$); ^b Significantly different from the negative control ($p < 0.001$).

5. ANEXOS

5.1 ANEXO 1 - Carta de submissão do artigo "Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice" ao *Journal of Ethnopharmacology*.

Zimbra

edson.maistro@marilia.unesp.br

Submission Confirmation for your paper

De : Journal of Ethnopharmacology
<jethnoph@chem.leidenuniv.nl>

Seg, 26 de Dez de 2011 09:33

Remetente : ees jep 0 161a3c e06a052f
<ees.jep.0.161a3c.e06a052f@eesmail.elsevier.com>

Assunto : Submission Confirmation for your paper

Para : edson maistro <edson.maistro@marilia.unesp.br>

Dear Dr.Maistro,

Your submission entitled "Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice." has been received by journal Journal of Ethnopharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

5.1. ANEXO 2 - Parecer do Comitê de Ética Experimental da Faculdade Medicina de Marília, SP.



FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA
Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos – CEP/FAMEMA

Marília, 14 de Abril de 2010

Ilmo(a) Sr.(a)
Prof. Dr. Edson Luis Maistro
Marília/SP

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Marília, recebeu o protocolo de estudo nº 084/10, intitulado: "Investigação do Potencial Genotóxico e Antigenotóxico do Extrato de Brassica Oleraceae in Vivo", foi considerado **APROVADO "Ad Referendum"** após responder as pendências apontadas em Reunião Ordinária – 29/03/10, de acordo com a Resolução 196/96 e suas Complementares do Conselho Nacional de Saúde, podendo ser iniciado

Sendo só para o momento, reiteramos protestos de consideração e apreço.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Valdeir Fagundes de Queiroz
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos