



“Estudo da citotoxicidade, genotoxicidade, monitoramento do Ciclo celular, indução de apoptose e expressão gênica, dos Extratos de folhas e caules de *Rubus rosifolius* em células humanas em cultura”

Ana Paula Oliveira de Quadros

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biomoléculas: estrutura e função.

Orientador: *Prof. Dr. Edson Luis Maistro*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

"Estudo da citotoxicidade, genotoxicidade, monitoramento do
Ciclo celular, indução de apoptose e expressão gênica, dos
Extratos de folhas e caules de *Rubus rosifolius* em células
Humanas em cultura"

Ana Paula Oliveira De Quadros

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração: Biomoléculas: estrutura e função.
Orientador: *Prof. Dr. Edson Luis Maistro*

**BOTUCATU – SP
2021**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Quadros, Ana Paula Oliveira de.

Estudo da citotoxicidade, genotoxicidade, monitoramento do ciclo celular, indução de apoptose e expressão gênica, dos extratos de folhas e caules de *Rubus rosifolius* em células humanas em cultura / Ana Paula Oliveira de Quadros. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Edson Luis Maistro
Capes: 20100000

1. Apoptose. 2. Expressão gênica. 3. Genotoxicidade.
4. Ciclo celular. 5. Rosaceae.

Palavras-chave: Apoptose; Ciclo celular; Expressão gênica; Genotoxicidade; Rosaceae.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

PG-BGA

*Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Denise,
minhas irmãs Ana Carolina e Ana Flávia,
meu noivo Vinicius e a todos
que me apoiaram nesta etapa.*



Agradecimentos

Expresso meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Edson Luis Maistro pela orientação, confiança, apoio e por dividir comigo seus conhecimentos.

Ao Dr. Rivaldo Niero da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALE), pela colaboração na obtenção dos extratos de *Rubus rosifolius*.

Aos Drs. Paulo Cesar Pires Rosa e Alexandra Christinie Helena Frankland Sawaya da UNICAMP pela caracterização fitoquímica dos extratos.

Ao Dr. Mário Sergio Mantovani da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela colaboração nos ensaios de citometria de fluxo e expressão gênica.

As alunas de Iniciação Científica da UNESP de Marília, pela participação nas análises de genotoxicidade dos extratos.

À minha mãe, por ser um exemplo a ser seguido como mulher, quanto a sua persistência, dedicação e amor em tudo o que faz e, ao meu pai, um homem vencedor e protetor. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Às minhas irmãs Carol e Flávia por suas companhias, amizade, apoio e exemplo.

Às minhas avós Cleuza e Branca por todos os conselhos, lições de vida, mimos. Também aos meus avôs Paulo e Olavo, que mesmo não estando mais presente entre nós me acompanham por onde quer que seja.

Ao meu noivo Vinicius por toda a força, companheirismo e apoio durante esta jornada.

Aos colaboradores que direta ou indiretamente foram essenciais para esta produção.

Aos doadores de amostras para o presente estudo.



Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu.

Aos funcionários, professores e alunos do programa, por proporcionarem um ambiente de trabalho alegre e prazeroso e me auxiliarem quando preciso.

E por fim, as agências de fomento que financiaram o estudo com auxílio à pesquisa: FAPESP, CAPES e CNPq.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

PG-BGA

*"Quando pensar em desistir,
lembre-se porque começou."*



LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1	Transformação de Tetrazolium MTT para sais de Formazan	25
Figura 2	Classes observadas de cometas	26
Figura 3	Formação de micronúcleos e representação com Citocalasina B	28
Figura 4	Parâmetros avaliados no teste do micronúcleo	28
Artigo 1		
Figura 1	Porcentagem de células HepG2/C3A viáveis após 24, 48 e 72 h de exposição a diferentes concentrações do extrato de folhas de <i>R. rosaefolius</i> . Avaliação feita pelo teste do MTT.	61
Figura 2	Efeitos do extrato de folhas de <i>R. rosaefolius</i> sobre o ciclo celular de células HepG2/C3A por citometria de fluxo.	62
Figura 3	Efeitos do extrato de folhas de <i>R. rosaefolius</i> sobre mecanismos de apoptose de células HepG2/C3A por citometria de fluxo	63
Tabela 1	Análise fitoquímica do extrato de folhas de <i>R. Rosaefolius</i>	63
Tabela 2	Migração do DNA no ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato de folhas de <i>R. rosaefolius</i> em células HepG2/C3A	64
Tabela 3	Frequência de células binucleadas com micronúcleo (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) em células HepG2/C3A expostas ao extrato de folhas de <i>R. rosaefolius</i>	64
Tabela 4	Expressão relativa dos genes utilizados nas reações de PCR-RT, suas respectivas seqüências primers e funções. Tratamento com o extrato de folhas de <i>R. rosaefolius</i> .	65
Artigo 2		
Figura 1	Análise fitoquímica do extrato de caules – cromatografia de íons	77
Figura 2	Análise fitoquímica do extrato de caules – espectrometria de massa	77
Figura 3	Porcentagem de células HepG2/C3A viáveis após 24, 48 e 72 h de exposição a diferentes concentrações do extrato de caules de <i>R. rosaefolius</i> . Avaliação feita pelo teste do MTT.	78
Tabela 1	Migração do DNA no ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato de caules de <i>R. rosaefolius</i> em células HepG2/C3A	79
Tabela 2	Frequência de células binucleadas com micronúcleo (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) em células HepG2/C3A expostas ao extrato de caules de <i>R. rosaefolius</i>	79
Tabela 3	Efeitos do extrato de caules de <i>R. rosaefolius</i> sobre o ciclo celular de células HepG2/C3A.	80
Tabela 4	Efeito do extrato de caules de <i>R. rosaefolius</i> em células HepG2/C3A em relação a apoptose.	80
Tabela 5	Expressão relativa dos genes utilizados nas reações de PCR-RT, suas respectivas seqüências primers e funções. Tratamento com o extrato de caules de <i>R. rosaefolius</i> .	81
Artigo 3		



Figura 1	Viabilidade de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) após 24, 48 e 72 h de exposição as diferentes concentrações do extrato de folhas de <i>R. rosaefolius</i> .	102
Figura 2	Porcentagem de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) após 24, 48 e 72 h de exposição as diferentes concentrações do extrato de caule de <i>R. rosaefolius</i> .	102
Tabela 1	Migração do DNA no ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato de folhas de <i>Rubus rosaefolius</i> em células mononucleares do sangue periférico após 4 horas de exposição	103
Tabela 2	Migração do DNA no ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato de caule de <i>Rubus rosifolius</i> em células mononucleares do sangue periférico após 4 horas de exposição	104
Tabela 3	Frequência de células binucleadas com micronúcleo (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos de sangue periférico expostos ao extrato de folhas de <i>R. rosaefolius</i>	104
Tabela 4	Frequência de células binucleadas com micronúcleo (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos de sangue periférico expostos ao extrato de caule de <i>R. rosaefolius</i>	105



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	Food and Drug Administration
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
AO	Ácido Oleanólico
CASP 9	Caspase 9
CASP 3	Caspase 3
CASP 8	Caspase 8
PARP-1	<i>Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1</i>
PUMA	<i>P53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>
HepG2/C3A	Hepatocarcinoma humano derivado de HepG2
BIRC-5	Baculoviral IAP Repeat Containing 5
ROS	Espécies Reativas do Oxigênio
MTT	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazolina
pH	Potencial hidrogeniônico
HepG2	Hepatocarcinoma
CYP	Citocromo p450
SCGE	Single-Cell Gel Electrophoresis
MN	Micronúcleo
PNP	Ponte Nucleoplasmática
BN	Broto Nuclear
MNCtB	Micronúcleo com bloqueio de citocinese
CtB	Citocalasina B
CBMN	Cytokinesis-block micronucleus
FSC	Forward Light Scatter
SSC	Side Light Scatter
G1	GAP 1
G2	GAP 2
G0	GAP 0
S	Síntese do DNA
BCl-2	Apoptosis Regulator
RT-PCR	Transcription Polymerase Chain Reaction



AhR	Aril Hidrocarboneto
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
GPX1	Glutationa peroxidase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ESI	Eletrospray
FAB	Bombardamento Rápido de Átomos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	Tampão Fosfato Salino
LMP	Agarose de Baixo Ponto de Fusão
MMS	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium
IDN	Índice de Divisão Nuclear
ANOVA	Análise da variância
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1 ^a
c-MYC	Proto-Oncogene C-Myc
GADD45A	Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha
H2AFX	H2A Histone Family Member X
BBC3	BCL2 Binding Component 3
BECN1	Beclin 1
CYP1A1	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1
CYP1A2	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 2
CYP3A4	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4
Ct	Cycle Threshold
rpm	rotações por minuto
Tr	Tempo de Retenção
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
RTK	Receptor de Tirosino-Quinase
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato



Thr 308	Triptofano na posição 308 da estrutura primária da proteína
Ser 473	Serina na posição 473 na estrutura primária da proteína
mLST8	proteína letal 8 com sec13
GβL	Proteína G, subunidade β
PRAS40	Substrato de AKT rico em prolina de 40kDa
Depor	Proteína com domínio DEP que interage com mTOR
PKD2	Proteína quinase 2-dependente de fosfoinosítido
S6K1	p70 ribossomal S6 kinase 1
GTP	Guanosine triphosphate (GTP)
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RNA	Ácido Ribonucleico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HeLa	Linha de célula de câncer cervical
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
AKT	Serine/threonine-protein kinase
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
BAX	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
7-AAD	7-aminoactinomycin D
DEPC	Dietil pirocarbonato
UHPLC-MS	Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometer
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
CO ₂	Dióxido de carbono



Resumo

As plantas com propriedades medicinais têm sido catalogadas, pesquisadas e usadas desde a antiguidade, permanecendo até hoje como fonte para o tratamento de diferentes condições. Contudo, tal utilização pode ser arriscada se não feita devidamente, daí a importância de pesquisas sobre a atividade genotóxica e citotóxica da planta em sua totalidade, bem como dos seus componentes. *Rubus rosifolius*, popularmente conhecida como “amora vermelha”, é uma planta medicinal comum na região Sul do Brasil, de fácil acesso, porém com propriedades biológicas pouco estudadas. Os principais usos atribuídos a ela são: antidiarreicos, para doenças estomacais, analgésico, antimicrobiano, anti-hipertensivo, dentre outras. Investigar e detalhar os potenciais efeitos tóxicos de plantas e seus constituintes é, portanto, imprescindível para que se possa garantir a segurança de seus usuários, assim como criar propostas farmacêuticas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar o extrato de folhas e de caules de *R. rosifolius* quanto aos seus potenciais efeitos citotóxicos e genotóxicos por meio de ensaios biológicos *in vitro* em células de hepatoma humano (HepG2/C3A) e leucócitos humanos. Os ensaios de citotoxicidade pelo teste do MTT e coloração com azul de tripan, nas concentrações entre 0,01 e 100 µg/ml de ambos os extratos, não evidenciaram diminuição significativa na viabilidade celular de células HepG2/C3A e leucócitos. Na exposição dos dois tipos celulares ao extrato de folhas, pôde-se observar efeitos genotóxicos (ensaio cometa e teste do micronúcleo) em concentrações a partir de 1 µg/ml, aumento no número de células na fase S do ciclo celular (HepG2/C3A), bem como aumento de células em apoptose nas concentrações de 10, 20 e 100 µg/ml (análises por citometria de fluxo em HepG2/C3A). Também foi observado aumento na expressão gênica do gene de metabolização de xenobióticos *CYP3A4* (pelo ensaio RT-qPCR). A genotoxicidade induzida pelo extrato possivelmente foi a principal causa do aumento do número de células na fase S do ciclo, numa tentativa de reparar o dano genético, e em apoptose, como indicado pelo aumento da expressão do gene *CASP7*. Nas análises do extrato de caules, foram observados efeitos genotóxicos nos dois tipos celulares a partir da concentração de 1 µg/ml. O ensaio com o citômetro de fluxo indicou aumento de células HepG2/C3A na fase G2/M (na concentração de 10 µg/ml e aumento de células em G0/G1 (na concentração de 100 µg/ml), bem como aumento de células em apoptose nas três concentrações testadas. Nas análises de expressão gênica, apenas o gene *CYP1A2* de metabolização de xenobióticos teve a expressão relativa



aumentada. Novamente os resultados indicam que os danos genotóxicos do extrato possivelmente foram responsáveis pelas alterações no ciclo celular e pelo aumento de células em apoptose. Diante das condições experimentais do presente estudo, os dados obtidos permitem concluir que os extratos de folhas e de caules de *R. rosifolius* apresentam toxicidade celular e genética, tanto em células com metabolização hepática ativa (HepG2/C3A), quanto em células sem metabolização por enzimas hepáticas (leucócitos humanos).

Apoio financeiro do projeto: CAPES, CNPq e FAPESP.

Palavras-chave: Ciclo celular, expressão gênica, genotoxicidade, apoptose, citotoxicidade, Rosaceae, ensaio cometa.



ABSTRACT

Plants with medicinal properties have been catalogued, researched, and used since antiquity, remaining until today as a source for the treatment of different conditions. However, such use can be risky if not done properly, hence the importance of research on the genotoxic and cytotoxic activity of the plant, as well as its components. *Rubus rosifolius*, popularly known as "red mulberry", is a medicinal plant common in southern Brazil, easily accessible, but with little studied biological properties. Its main uses: antidiarrheal, for stomach diseases, analgesic, antimicrobial, antihypertensive, among others. Investigating the potential and toxic effects of plants and their constituents is, therefore, essential to guarantee the safety of their users, as well as to create pharmaceutical proposals. In this context, the present study aimed to analyze the extract of leaves and stems of *R. rosifolius* regarding their potential cytotoxic and genotoxic effects through in vitro biological assays in human hepatoma cells (HepG2/C3A) and human leukocytes. Cytotoxicity assays by the MTT test and trypan blue staining, if between 0.01 and 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of both extracts, did not show a decrease in cell viability of HepG2 / C3A cells and leukocytes. In exposing the two types of cells to the leaf extract, genotoxic effects (comet assay and micronucleus test) could be observed, due from 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$, an increase in the number of cells in the S phase of the cell cycle (HepG2 / C3A), as well as increase of cells in apoptosis in applications of 10, 20 and 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (analysis by flow cytometry in HepG2 / C3A). Increased gene expression of the xenobiotics metabolizing gene CYP3A4 (by RT-qPCR assay) was also observed. The extract-induced genotoxicity was possibly the main cause of the increase in the number of cells in the S phase of the cycle, to repair the genetic damage, and in apoptosis, as indicated by the increased expression of the CASP7 gene. In the analysis of the stem extract, genotoxic effects were



observed in both cell types from the concentration of 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$. The flow cytometer assay indicated an increase in HepG2 / C3A cells in the G2/M phase (at a concentration of 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and an increase in cells in G0 / G1 (at a concentration of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$), as well as an increase in cells in gene expression analysis, only the xenobiotic metabolizing gene CYP1A2 had increased expression. Again, the results reported that the genotoxic damage of the extract was possibly responsible for the changes in the cell cycle and the increase in cells undergoing apoptosis. The experimental data of the present study confirmed that extracts from leaves and stems of *R. rosifolius* have cellular and genetic toxicity, both in cells with active hepatic metabolism (HepG2 / C3A) and in cells without metabolism by liver enzymes (leukocytes humans).

Financial support for the project: CAPES, CNPq and FAPESP.

Keywords: Cell cycle, gene expression, genotoxicity, apoptosis, cytotoxicity, Rosaceae, comet assay.



SUMÁRIO

1	Introdução	18
1.1	Legislação e explanação sobre uso de produtos naturais	18
1.2	Considerações sobre o gênero <i>Rubus</i> e a espécie <i>Rubus rosifolius</i>	19
1.3	Genética toxicológica	21
1.4	Avaliação de Viabilidade Celular e Citotoxicidade	24
1.5	Ensaio Cometa	25
1.6	Micronúcleo	27
1.7	Citometria de fluxo	29
1.8	Expressão Genica – RT- qPCR em Tempo Real e Cultura Celular	31
2	Objetivos	32
3	Referências	33
4	Artigo 1 - Risk assessment via genotoxicity, metabolism, apoptosis, and cell growth effects in a HepG2/C3A cell line upon treatment with <i>Rubus rosifolius</i> (Rosaceae) leaves extract	42
5	Artigo 2 - Avaliação da toxicidade celular e genética do extrato de caules de <i>Rubus rosifolius</i> em células HepG2/C3A	66
6	Artigo 3 - Investigação de potencial citotóxico e genotóxico dos extratos de folhas e caules de <i>Rubus rosifolius</i> em leucócitos humanos	94
7	Considerações finais	116
	Anexo I – Comprovante de publicação	117
	Anexo II – Aprovação no Comitê de ética	118



1. INTRODUÇÃO

1.1. Legislação e explanação sobre uso de produtos naturais

Segundo a Lei nº 6.360/1976 da Casa Civil, que dispõe sobre a Vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, em seu 16º artigo qualquer droga ou insumo farmacêutico de origem natural deve obedecer a exigências próprias constando de análise e comprovação científica que assegure sua eficácia e segurança, além de possuir dados como identificação físico-química e atividade dele. No ano de 2004, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina, em sua resolução de número 90/2004, a publicação do guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápico.

No ano de 2008 o Ministério da Saúde Brasileiro aprovou através do decreto número 2.960 o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e criou, também, o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos; nesse mesmo decreto considerou que as ervas medicinais podem ser usadas como estratégia para reforçar o emprego da agricultura familiar e geração de renda, assim como no uso sustentável da biodiversidade brasileira, no avanço tecnológico e na melhoria dos cuidados à saúde da população (BRASIL, 2008; CARVALHO et al. 2012).

No Brasil, existem aproximadamente 512 medicamentos fitoterápicos registrados na ANVISA além de grande biodiversidade ainda a ser catalogada e estudada. Produtos naturais podem ser facilmente encontrados em feiras livres, mercados e quintais residenciais.

As plantas medicinais podem ser definidas como qualquer material de origem vegetal utilizado pelo homem com fins terapêuticos (BRASIL, 2010). A medicina fitoterápica tem sido usada desde tempos antigos como estratégias naturais para solução de problemas de saúde humana. O uso de chás, óleos e infusões serve como base para pesquisa farmacêutica através do uso de plantas isoladas ou combinadas (FALZON 2017, COLALTO 2018). Estudos mostram que aproximadamente 80% da população de países em desenvolvimento são dependentes das plantas na atenção primária à saúde e, mais de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente derivam direta ou indiretamente das plantas, sendo que 11% fazem parte da lista de medicamentos essenciais, de acordo com dados da OMS (POPOVIC 2016, MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ 2018, ZOR 2020). Compilando alguns estudos, se vê que, ainda



que com técnicas mais modernas, tais como modelagem molecular e química combinatória entre outras, o uso de plantas tradicionais ao conhecimento popular se estende cada vez mais a empresas farmacêuticas e organizações financeiras (NEWMAN et al., 2000, 2003; BUTLER, 2004).

Apesar do amplo uso das plantas na medicina tradicional, e seu grande potencial como fonte de novos medicamentos, o estudo destas ainda é pouco explorado, uma vez que das, aproximadamente, 500 mil espécies de plantas existentes no planeta, apenas 15% já foram estudadas fitoquimicamente e 6% farmacologicamente (CRAGG, NEWMAN, 2013; SHANAIDA 2020). Neste contexto, o Brasil é beneficiado, pois, devido às suas boas condições climáticas e hídricas, apresenta uma alta diversidade de espécies nativas e propicia que espécies estrangeiras se reproduzam de forma adequada, gerando assim grande quantidade de matéria prima disponível (GOBBO NETO, 2007; ZUANAZZI 2010). Contudo, existe no Brasil um relativo atraso nas pesquisas, ficando atrás inclusive de países com menos desenvolvimento científico (YUNES *et al.*, 2001). Evidenciado pelo fato de que, até o ano de 2008, todos os fitoterápicos registrados no país, apenas 30%, eram derivados de plantas originárias da América do Sul (CARVALHO *et al.*, 2008).

A comprovação científica dos efeitos desencadeados pelo uso das plantas medicinais não indica que seu uso deva ser feito por qualquer indivíduo, em quaisquer condições. O surgimento de efeitos indesejáveis, e até mesmo prejudiciais, pode ocorrer devido a inúmeros fatores, como toxicidade, contaminação ou mesmo interação com outras drogas (RATES, 2001; ZHOU et al., 2004).

Devido a ampla utilização e a possível ocorrência de efeitos adversos advindos de produtos naturais, algumas agências de regulamentação e fiscalização, nacionais e internacionais, recomendam alguns testes, dentre eles, testes de genotoxicidade e citotoxicidade (CNS, RE251/97; ANVISA, RE90/2004; OECD, 2001; OECD, 2016).

1.2. Considerações sobre o gênero *Rubus* e a espécie *Rubus rosifolius*

O gênero *Rubus* compreende aproximadamente 715 espécies divididas em 12 subgêneros que se encontram em todos os continentes, exceto na Antártica. Essas plantas têm sido cultivadas há séculos, principalmente para o consumo de seus frutos, mas outras partes



são também utilizadas para fins medicinais, devido a grande quantidade de taninos (ALVES et al. 2014; FINN et al. 2008; PATEL, 2004; TOLENTINO et al. 2015). Taninos são polifenóis naturais que atuam como defensores das plantas contra-ataques de herbívoros, tornando seu sabor desagradável, principalmente quando não estão suficientemente maduros. Em 2008, Niero *et al.* publicaram uma revisão sobre o potencial terapêutico e composição química de várias espécies do gênero, dando destaque as espécies encontradas no Brasil, pode-se verificar o potencial analgésico, hipoglicemiante, antimicrobiano e antiviral da *R. imperialis*, bem como o potencial antioxidante e relaxante da *R. idaeus*. Além dos estudos sobre potenciais terapêuticos, alguns estudos prévios envolvendo a biossegurança do uso de plantas do gênero *Rubus* têm revelado preocupantes efeitos citotóxicos e genotóxicos. Nas espécies *R. imperialis* (Alves et al. 2014) e *R. niveus* (Tolentino et al. 2015), os autores reportaram efeitos clastogênicos/aneugênicos dos extratos de partes aéreas dessas plantas em ensaios in vivo com camundongos.

Rubus rosifolius é uma planta da família Rosaceae, amplamente distribuída em todas as regiões do mundo e na região Sul brasileira, sendo um arbusto, de médio porte, podendo atingir até 5 metros (KANEGUSUKU, 2016). Popularmente pode ser encontrada sob o nome de "Amora- vermelha". Existem poucos e recentes estudos abrangendo uso da Amora-vermelha. O mais antigo encontrado nos bancos de dados data de 2002, quando Claudia Mauro de seus colaboradores realizaram um estudo botânico e fitoquímico da planta além da atividade antimicrobiana comparada a compostos comprovadamente antimicrobióticos.

Em 2007 pesquisadores avaliaram o potencial antinociceptivo do extrato de *R. rosifolius* em camundongos (KUNEGUSUKU *et al.*, 2007). Este mesmo potencial foi observado em 2015 por pesquisadores brasileiros, que também puderam observar nas suas pesquisas atividade antimicrobiana, ~~antibacteriana~~ e antiproliferativa em células de glioma, o que pode indicar um potente novo composto quimioterápico (PETREANU *et al.*, 2015).

Também estudando a atividade antimicrobiana, em 2011, um grupo de pesquisadores sugeriu que, devido ao seu potencial antimicrobiano, *R.rosifolius* poderia substituir ou mesmo diminuir o número de conservantes sintético em formulações tópicas (OSTROSKY *et al.*, 2011).



Em um estudo realizado em uma universidade na região sul do Brasil, extrato de folhas e extrato de caules de *R. rosifolius* foram testados fitoquimicamente e farmacologicamente. Foram observados efeitos antidepressivos, antiproliferativos e gastroprotetor comparados com os medicamentos mais utilizados para cada caso. O efeito que mais teve destaque foi o efeito gastroprotetor, dose-dependente, do extrato de caules quando comparado ao uso de Omeprazol (PETREANU,2015).

Um estudo mais recente realizado com sete frutas, entre elas a Amora-vermelha, encontradas no Sul do Brasil avaliou propriedades fitoquímicas, antioxidantes e anticancerígenas de extratos das mesmas (BAGATTOLI *et al.*, 2016). No mesmo ano um estudo foi publicado acerca dos efeitos diuréticos exercidos pelo extrato de *R. rosifolius* (SOUZA *et al.*, 2016).

1.3. Genética toxicológica

Uma mutação pode ser definida como uma mudança na sequência do DNA, que pode levar ou não a uma alteração da função gênica (RIBEIRO *et al.*, 2003; FRIEDBERG 2006). Sendo assim o estudo dessas mutações através da Genética Toxicológica se faz estritamente necessário quando qualquer medicamento, fitoterápico ou não, entra em circulação. O objetivo deste tipo de estudo nada mais é que identificar e analisar as possíveis interações entre materiais genéticos e agentes tóxicos. Para o sucesso de tais estudos, o entendimento das propriedades físico-químicas dos compostos e os seus efeitos sobre as células são fundamentais, permitindo demonstrar o potencial do composto de comprometer o organismo exposto e até mesmo levar a sua morte (ARNAIZ, 1995).

É de conhecimento amplo que mutações ocorrem nos seres vivos ao longo de sua vida, se mostrando determinante para a evolução das espécies, bem como para a diversidade biológica. Por outro lado, as mutações também podem acarretar doenças genéticas e desajustes celulares. De forma natural as células apresentam selecionadas ao longa da sua história que reparam danos ocasionalmente causados ao DNA. Dentre estes mecanismos podemos citar o BER (base excision repair), o NER (nucleotide excision repair), o reparo por recombinação e o MMR (mismatch repair). O BER é conhecido por atuar principalmente em danos causados por agentes endógenos; seu mecanismo inicia-se pelo reconhecimento e



excisão de bases danificadas pelas DNA glicosilases sem ou com atividade 3'-AP liase associada, a excisão da base resulta em um sítio abásico (AP - apurínico ou apirimidínico) sem ou com incisão 3', que é reconhecido por outro grupo de enzimas, as AP-endonucleases, que fazem a incisão na extremidade 3' ou 5' do sítio AP, gerando uma lacuna. Esta é preenchida pela ação da polimerização e ligação de novos nucleotídeos à sequência de DNA. O NER atua principalmente em danos provocados por agentes exógenos que causam distorção da dupla hélice do DNA, a atuação envolve ao menos 30 proteínas atuantes em 5 processos: reconhecimento da lesão; abertura da dupla hélice de DNA onde está localizada a lesão; dupla incisão distante alguns nucleotídeos dos lados 5' e 3' do sítio da lesão; síntese do novo DNA utilizando como molde a fita não danificada e ligação da porção 5' da nova fita sintetizada à cadeia pré-existente. O mecanismo de reparo por recombinação pode atuar em lesões com a dupla quebra da cadeia de DNA. Existem duas direções envolvidas no reparo desse tipo de lesão: recombinação homóloga (HR – "homologous recombination"), que assegura um reparo bastante preciso; e junção de pontas não homólogas (NHEJ – "non-homologous end joining"), sujeito a erro (BERRA et al., 2006). Além destes também temos o MMR (mismatch repair) ou reparo de erros de pareamento de bases, que tem como principal função eliminar bases erroneamente selecionadas e inserções ou deleções que surgem pelo deslizamento da polimerase durante a replicação do material genético (PINTO & FELZENSZWALB, 2003). Uma falha em qualquer um destes mecanismos pode levar a um processo de carcinogênese.

Evidências crescentes sugerem que o dano no DNA, expresso principalmente como mutações, está envolvido na indução de muitos tipos de câncer (SARASIN 2003, LI 2018, ZHANG 2020). Além de seu papel na carcinogênese, as mutações podem ainda possuir papel crítico no processo de envelhecimento e no desenvolvimento de doenças autoimune e crônico-degenerativas (FENECH, 2000; DE FLORA & FERGUNSON, 2005; SAKUMI 2019).

Um aumento no número de mutações, alterando a sequência das bases do DNA pode ser causado pelos agentes mutagênicos, podendo acelerar ou ainda aumentar o aparecimento do processo carcinogênico. O aparecimento do câncer pode ser acarretado pela perda do controle da divisão celular como resultado do número elevado de mutações após sucessivas divisões celulares (RIBEIRO *et al.*, 2003; ZHANG 2020).

Os testes padronizados para avaliação de genotoxicidade podem ser realizados em vários organismos e resultando em informações seguras e precisas quanto a potencialidade do



agente de causar danos ao DNA (FERNANDES, 2005). Para identificar e analisar esses chamados agentes mutagênicos é necessário o conhecimento sobre os processos mutacionais e os fatores desencadeantes destes, sendo assim possível a administração com redução de riscos (SILVA *et al.*, 2003).

Os agentes mutagênicos podem ser drogas, detergentes, cosméticos, agrotóxicos, fitoterápicos, dentre outros, e atualmente têm sua ação sobre as células investigada principalmente através de testes realizados em culturas celulares. No entanto, os resultados obtidos nestes chamados estudos "in vitro" não devem ser diretamente repassados a animais, mas servem como referências e suporte para uma avaliação de possíveis efeitos no sistema biológico. É provado que se um agente causa danos em cultura celular, possivelmente ele também causará algum efeito similar em organismos completos (CARVALHO, 1996). Métodos de estudo "in vitro" em Genética Toxicológica são amplamente utilizados por possibilitarem uma melhor padronização das etapas e características do ensaio, como temperatura, pH, tempo de tratamento, combinação de substâncias, variação de doses, entre outros, além de se obter resultados expressivos sem o sacrifício de grande quantidade de animais (ROGERO *et al.*, 2003, LIU 2019).

Não devem existir dúvidas de que os testes de avaliação de genotoxicidade devem fazer parte de um sistema de análise de todos os agentes químicos, físicos ou biológicos a que o homem venha a ser exposto. Para tanto, alguns protocolos e diretrizes regulatórias internacionais têm sido frequentemente determinados na tentativa de padronização de alguns testes de genotoxicidade, sendo estes amplamente recomendados. De acordo com a literatura, o teste do micronúcleo, o ensaio cometa e o teste de Ames são testes recomendados por órgãos de regulamentação técnica, fazendo parte de uma bateria de testes impressindíveis (CHOY, 2001; CANDIDO-BACANI *et al.*, 2011; ANVISA, 2013).

A avaliação da genotoxicidade ganha cada vez mais importância à medida que a sociedade se desenvolve e o número de substâncias estranhas ao organismo humano cresce. Esses xenobióticos podem interagir de diversas formas com o homem, sendo benéficos, prejudiciais ou indiferentes frente ao contato. Por isso é imprescindível identificar os agentes potencialmente prejudiciais e estabelecer normas para o seu uso (REIFFERSCHIED & HEIL, 1996). Observações epidemiológicas e estudos adicionais em animais e outros sistemas-teste



mostram que inúmeros agentes aos quais estamos constantemente expostos são capazes de induzir danos no DNA (WOGAN *et al.*, 2004).

1.4. Avaliação de Viabilidade Celular e Citotoxicidade

Anteriormente a qualquer teste se faz necessária a utilização de um ensaio para que se possa determinar quais concentrações da droga em estudo poderão ser utilizadas sem que haja um efeito tóxico no organismo estudado. Para isto consideramos dosagens que apresentem ao menos 80% de viabilidade celular (RISSET *et al.*, 2013).

Um teste usado tradicionalmente para detecção de viabilidade celular é o do azul de tripan, que, por se tratar de um corante que não consegue atravessar membranas íntegras, as células vivas não permitem a passagem deste, fazendo com que as células não sejam coradas. Desta forma, somente células cujas membranas se encontram danificadas se encontraram da cor azul. O protocolo mais utilizado para este teste é o descrito por Panda *et al.* (2012).

Além do teste de azul de Tripan para verificação de citotoxicidade outro teste pode ser utilizado. O teste do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium) descrito por Mosmann e que sofreu algumas modificações por Denizot e Lang (Freimoser *et al.*, 1999). O teste demarca qual a porcentagem de células que foi capaz de transformar o MTT em formazan, ou seja, qual porcentagem está viva. Essa transformação pode ser vista pela aparência de cor roxa da solução, ela ocorre através do metabolismo das mitocôndrias dos organismos vivos. Nas mitocôndrias ocorre uma redução que se utiliza de moléculas de NADH e similares para transferência de elétrons. Com isso há a formação de um produto que se precipita e se acumula no fundo de cada pocinho. Para que seja possível a dissolução deste precipitado é adicionada ao meio DMSO (dimetilsulfóxido), e a leitura é realizada através de software específico aplicado a um espectrofotômetro (Riss *et al.*, 2013).

A realização destes ensaios permite selecionar as concentrações utilizáveis ao longo do experimento, que podem trazer resultados mais satisfatórios.

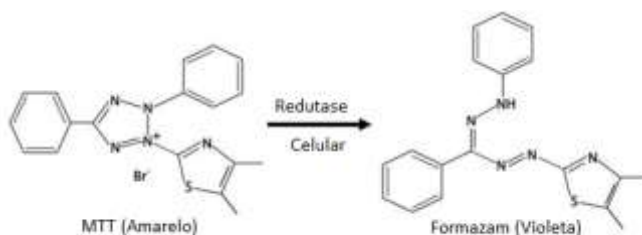


Figura 1 - Transformação de Tetrazolium MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazolina) com coloração amarela para sais de Formazan com pigmentação violeta, evidenciando a metabolização do sal pelas células (BOPP; LETTIERI, 2008).

1.5. Ensaio Cometa

O teste do cometa 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 uma técnica amplamente utilizada na Genética Toxicológica, por ser um método rápido, flexível, sensível para a detecção de danos primários no DNA e que necessita de um pequeno número de células por amostra e pequenas quantidades da substância teste para a sua execução (Tice *et al.*, 2000). De acordo com Gunasekarana (2015) em comparação com as várias técnicas, como PCR e FISH, os estudos mostraram que o teste cometa é método mais altamente sensível para detectar níveis baixos de danos no DNA, podendo os resultados serem obtidos num curto período. Além disso, o teste se sobressai devido à possibilidade de uso de vários tipos celulares, como células mononucleares do sangue periférico, células epiteliais bucais, células epiteliais nasais, epitélio do cristalino, espermatozoides, bem como tecidos de biópsia; tornando o ensaio uma ferramenta versátil e eficiente.

O mecanismo principal, proposto por Östling e Johanson (1984), é que o DNA é organizado em grandes estruturas supercoloidais 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 Olive (1989) a sugerir o nome “Comet Assay” (KLAUDE *et al.*, 1995; RIBEIRO & MARQUES, 2003; TICE *et al.*, 2000). 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 H₂O₂. 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.*, 1995; OECD, 2014).

Para a interpretação dos danos, as células são coradas e analisadas em microscópio de fluorescência, onde são verificados os tamanhos das caudas formadas em relação ao nucleóide, obedecendo aos seguintes critérios (SPEIT *et al.*, 1996, OECD 489, 2016)

- Classe 0 – sem danos (não apresenta cauda)
- Classe 1 – poucos danos (cauda menor que o tamanho do nucleóide)
- Classe 2 – danos moderados (cauda com tamanho até 2 vezes maior que o nucleóide)
- Classe 3 – danos intensos (cauda com tamanho superior a 2 vezes o nucleóide)
- Classe 4* - nucleóides sem a cabeça claramente definida (devem ser documentados separadamente, possivelmente representam células apoptóticas e necróticas).

* células apoptóticas e necróticas não são consideradas.

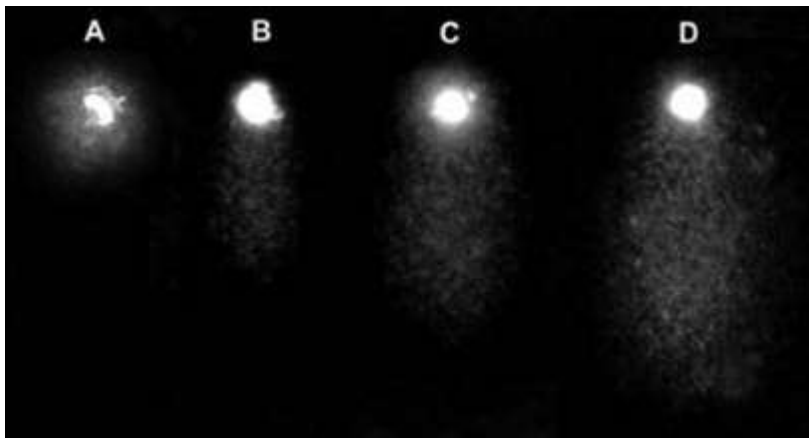


Figura 2: Classes observadas de cometas: A classe 0, B classe 1, C classe 2 e D classe 3 (CORTÉS-GUTIÉRREZ *et al.*, 2011).

Além de ser feita visualmente, a leitura dos cometas pode ser realizada de maneira automatizada com o auxílio de softwares específicos que, segundo a literatura, proporcionam resultados com alta semelhança (COLLINS, 2004; OECD 489, 2016).



Comparada com outras técnicas, a técnica do cometa apresenta algumas vantagens, 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 (TICE *et al.*, 2000).

1.6 Micronúcleo

O Teste do Micronúcleo (MN) 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; OECD TG 487, 2014).

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 cromatídeos e cromossomos inteiros ou cromátides que se não são associadas aos fusos mitóticos, devido a problemas, por exemplo, de polimerização das tubulinas, não sendo segregados para os polos celulares opostos, durante a anáfase, ficando ausente no núcleo núcleo-filho na telófase (FENECH, 2000). Apesar do teste do micronúcleo detectar efeitos clastogênicos (micronúcleo contendo fragmento do cromossomo) ou aneugênicos (micronúcleo contendo cromossomo inteiro), essa diferenciação pode ser vista através de outras técnicas, sendo a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) a mais segura, ou seja, sem este auxílio apenas se observa a presença ou ausência de micronúcleo nas células (MATEUCA *et al.*, 2006). Sistemas *in vitro* podem ser realizados com diversas linhagens celulares e são eficientes para detectar efeitos clastogênicos e aneugênicos. Segundo Valentin-Severin *et al.* (2003), uma substância micronúcleo positiva pode ser considerada mutagênica.

Devido ao fato do micronúcleo somente poder ser detectado em células que completam uma divisão nuclear, o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese é feito com a adição de Citocalasina B. Tal procedimento oferece grande vantagem porque os dados obtidos não são confundidos por alterações na cinética da divisão celular causada pela citotoxicidade dos agentes testados ou condições de cultura não adequadas. Além disso, com a

utilização simples de critérios morfológicos, permite a mensuração de genotoxicidade e citotoxicidade: quebras cromossômicas, perdas cromossômicas, rearranjos cromossômicos (pontes nucleoplasmáticas), inibição da divisão celular, necrose e apoptose (FENECH, 2000).

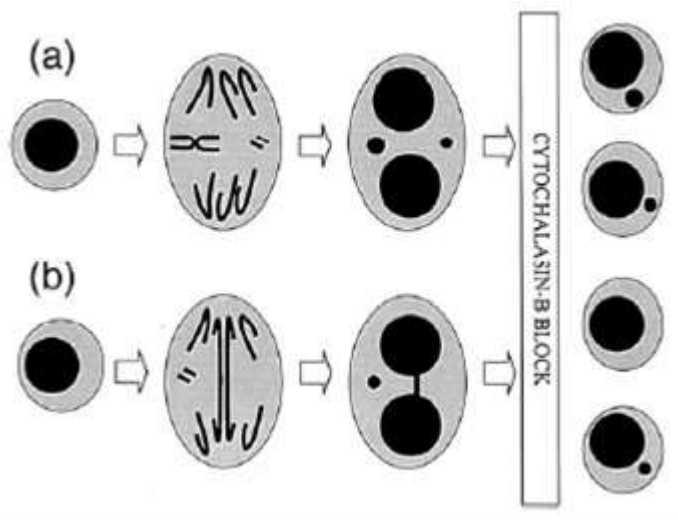


Figura 3: Formação de micronúcleos e representação com Cítocalasina B (FENECH, 2000).

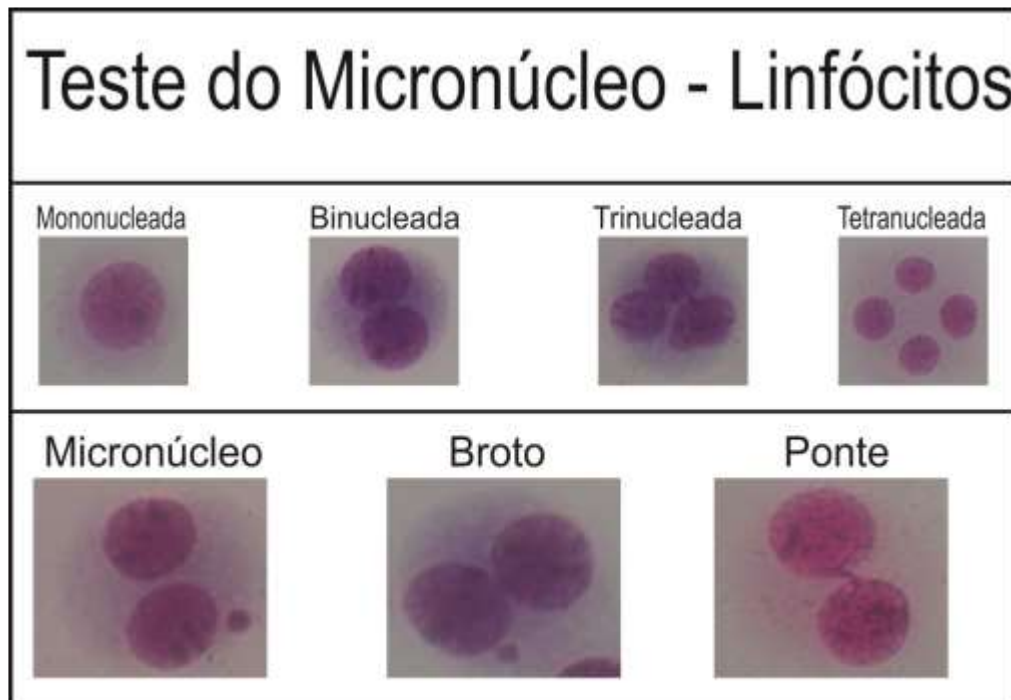


Figura 4. Teste do Micronúcleo em linfócitos humanos, com os parâmetros que são avaliados (FRODER, 2016).



Valentin-Severin *et al.* (2003) e Piperakis (2009) salientaram que 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.

1.7. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite múltiplas análises de células em solução. O citômetro é composto por lasers e detectores que convertem sinais de luz em sinais eletrônicos interpretados por sistema computacional. As populações celulares podem ser diferenciadas de acordo com sua fluorescência ou dispersão de luz. Os reagentes utilizados podem incluir anticorpos conjugados por fluorescência, corantes de ligação de ácido nucleico, corantes de viabilidade, corantes indicadores de íons e proteínas de expressão fluorescentes. A citometria de fluxo é uma ferramenta poderosa que tem aplicações em imunologia, biologia molecular, bacteriologia, virologia, biologia do câncer e monitoramento de doenças infecciosas (MCKINNON, 2018).

A capacidade de medição multiparamétrica de grandes populações de células com rapidez e precisão oferecida pela citometria tornou essa metodologia indispensável nos estudos de proliferação e morte celular (DARZYNKIEWICZ, 2001). Estudo de atividade imunomoduladora de extratos naturais em células mononucleares humanas, realizados por Junior *et al.* (2006), mostraram que a citometria de fluxo pode ser usada para investigar a ação de substâncias puras ou de extratos de plantas, sobre a viabilidade celular, bem como para avaliar a indução de morte celular programada.

O ciclo celular é um processo de ocorrência natural que visa a manutenção da quantidade de células e renovação, bem como a manutenção do conteúdo genético das células descendentes. Durante o ciclo ocorre uma sucessão de eventos que se iniciam com o processo de divisão celular (mitose). O período entre cada divisão celular completa recebe o nome de interfase, a qual pode ser dividida em três fases: G1, S e G2. G1 é um período em que a célula aumenta de volume e ocorre a síntese proteica; S é a fase de replicação do DNA e G2 se caracteriza por iniciar a mitose. Todo esse processo é coordenado por uma rede bioquímica complexa que sinaliza o andamento e a passagem de uma fase para outra. As vias podem responder a fatores extracelulares que através de uma cascata de sinalização fornecem estímulos para que a célula saia de G1 e entre em S modulada por fatores intracelulares (EKHOLM *et al.*, 2001). Para análise do ciclo celular, o conteúdo de DNA é detectado por



marcação com iodeto de propídeo (Propidium Iodide – PI), onde a intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de DNA presente nas células (JAYAT; RATINAUD, 1993; POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004)

Já a apoptose, ou morte celular programada, tem como característica alterações na fisiologia e metabolismo celular desde fragmentação do material genético com consequências marcantes no volume celular, até mesmo destruição do citoesqueleto e desfragmentação da carioteca. Ao final do processo apoptótico, a célula apresenta propriedades distintas das células normais e essa mudança faz com que ela seja fagocitada por macrófagos ou células vizinhas. Esse evento pode ser decorrente de processos naturais nas quais a célula deve entrar em apoptose por algum erro ou danos no DNA ou por regulação na quantidade de células, ou pode ocorrer em decorrência da ação de agentes mutagênicos (ALBERTS; JOHNSON, 2008). A apoptose pode ter início por dois tipos de sinalização: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca ou citoplasmática é desencadeada por receptores localizados na membrana plasmática capazes de desencadear a cascata das caspases; a via intrínseca tem como principal mediador as mitocôndrias, pois ao sofrerem algum tipo de estresse (hipóxia, falta de nutrientes, danos no DNA e ausência de fatores de crescimento) liberam moléculas efetoras da morte celular (GRIVICICH et al., 2007). Alguns genes como CASP-3 e BCL-2 podem se tornar ativos nesses processos e desencadear a produção de proteínas que atuarão como mediadoras e sinalizadoras nesse processo (MATIKAINEN et al., 2001; CHIPUK et al., 2010). O ensaio com anexina V detecta a apoptose pela identificação da perda da assimetria da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática de culturas de células, tecidos e embriões. Trata-se de uma proteína com 35-36 kDa dependente de Ca^{2+} que se liga fortemente e especificamente à resíduos de fosfatidilserina, expostos no folheto externo da membrana plasmática já no início da apoptose. Antes da externalização de fosfatidilserina, já houve a ativação da cascata de eventos bioquímicos que caracterizam a apoptose inicial (fragmentação do DNA, compactação da cromatina) e culminam na apoptose tardia (encolhimento e fragmentação celular, formação de corpos apoptóticos) (FRANGIONI, 2003; VANGESTEL et al., 2011).

A anexina V não é capaz de marcar células viáveis porque não consegue atravessar a bicamada fosfolipídica das células, entretanto, pode marcar células necróticas. Assim, a dupla-marcação com corantes para ácidos nucleicos, impermeáveis à membrana (iodeto de propídeo, 7-aminoactinomicina D [7-AAD], azul de trypan), contribui para a discriminação



dos diferentes estágios de apoptose e necrose (BALAJI et al., 2013). Desta forma, a técnica de citometria de fluxo pode ser eficientemente aplicada para a quantificação e diferenciação de células apoptóticas e necróticas, marcadas com anexina V e 7-AAD, por exemplo. Células viáveis apresentarão marcação negativa para os dois corantes; células em apoptose inicial apresentarão marcação positiva para anexina V e negativa para 7-AAD; células em apoptose tardia/mortas apresentarão dupla-marcação positiva para ambos os corantes; e células necróticas apresentarão marcação negativa para anexina V e positiva para 7-AAD (VAN ENGLAND et al., 1998).

1.8. Expressão Genica – RT- qPCR em Tempo Real e Cultura Celular

Uma vez detectados danos no material genético nas células tratadas com o *R. rosifolius*, serão necessários estudos mais aprofundados da extensão dos danos no DNA. A técnica do Reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCT) em tempo real permite monitorar os produtos assim que eles são gerados (Valesket, 2005). Esta técnica é uma variante da técnica de PCR e é comumente utilizada para detectar expressão genica através da criação do DNA complementar transcrito a partir do RNA, com o auxílio da transcriptase reversa. Esta técnica permite também a quantificação do RNA com uma quantidade pequena de amostras, até mesmo de uma única célula (Dharmaraj, 2015). Danos no material genético podem levar a célula a desencadear alguns mecanismos como parada do ciclo celular, apoptose ou reparo de material genético e, através desta técnica se torna possível a identificação da abrangência dos danos genéticos. Ensaios baseados em RT-PCR em tempo real são métodos mais comuns para caracterização e confirmação de padrões de expressão gênica e para comparar níveis gênicos em diferentes populações (Mocellin et al., 2003). Desta forma, é possível, além de avaliar a diferença nos níveis de expressão gênica de células tratadas em relação a células não tratadas, obter informações a respeito dos mecanismos de ação de novas drogas.

Os ensaios *in vitro* foram conduzidos em dois tipos celulares: células metabolizadoras do fígado (HepG2/C3A) e células do sangue periférico humano. As células HepG2/C3A, linhagem de carcinoma hepatocelular, tem seu uso amplamente recomendado devido inibição de crescimento por contato, alta produção de albumina e alfa fetoproteína, além da habilidade de crescer em meio deficiente em glicose. A vantagem dessa linhagem é a capacidade de



metabolização que leva à expressão dos genes da família citocromo 450 (CYPs) e desempenha característica função metabolizadora de drogas (Chen et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Devido ao frequente uso de extratos da planta *Rubus rosifolius* e a estudos recentes mostrando mutagenicidade com extratos de plantas do mesmo gênero, compreende-se a urgente necessidade de se avaliar a citotoxicidade e toxicidade genética nas células, assim como estudar a expressão de genes da via de sinalização de danos no DNA. Os dados obtidos poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos de ação.

Frente ao uso popular do extrato de folhas e de caules de *Rubus rosifolius* como fitomedicamento, e a alguns estudos farmacológicos que comprovam os efeitos biológicos de extratos dessa planta, o presente estudo teve o objetivo de investigar o potencial citotóxico e genotóxico de extratos de partes aéreas dessa planta sobre células humanas providas de metabolização hepática (HepG2/C3A) e leucócitos humanos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico do extrato de folhas e extrato de caules de *Rubus rosifolius* através do ensaio de citotoxicidade MTT e coloração com azul de tripan, em células HepG2/C3A e linfócitos de sangue periférico.
- Avaliar o efeito genotóxico do extrato de folhas e extrato de caules *Rubus rosifolius* através do ensaio do cometa e teste do micronúcleo em células HepG2/C3A e linfócitos de sangue periférico.
- Analisar os efeitos do extrato de folhas e de caules de *R. rosifolius* sobre o ciclo celular e indução de apoptose em células HepG2/C3A, por citometria de fluxo.
- Analisar a expressão de genes da via de sinalização de danos no DNA, ciclo celular, apoptose e metabolização de xenobióticos em células HepG2/C3A.



3-Referências

ALBERTS, B., JHONSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. Molecular Biology of the Cell, 5 edition, Garland Sci. 2008.

ALVES, A. B. C. R. et al. Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (*Rosaceae*) extract in vivo and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. Journal of Ethnopharmacology, v. 153, n. 3, p. 694–700, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 90, de 16 de março de 2004. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RE_N_90_anvisa.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2012.

BALAJI, N.; DEVY, A.S.; SUMATHI, M.K.; VIDYALAKSHMI, S.; KUMAR, G.S.; D1SILVA, S. Annexin V – affinity assay: apoptosis detection system in granular cell ameloblastoma. Journal of International Oral Health, v.5, p. 25-3-, 2013

BOPP, S.K.; LETTIER, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. BMC Pharmacology, v.8, n.8, 2008

BRASIL, 2008. Portaria Interministerial Nº 2.960, de 9 de Dezembro de 2008. Aprova Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 dez. 2008. Seção 1. p. 56.

BRASIL, 2008. PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 2.960, DE 9 DE DEZEMBRO DE 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960_09_12_2008.html. Acesso em: 20 de Set, 2016.

BRASIL 2010 – RDC número 10 de 10 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à agência nacional de vigilância sanitária.

BRASIL, 2016. Lei nº 6.360, 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos,



Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. TÍTULO III - Do Registro de Drogas, Medicamentos e Insumos Farmacêuticos. Artigo 16. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6360.htm. Acesso em 20 Set, 2016.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 2141– 2153, 2004.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO. E. E.; MACIEL, A. PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, A C B; BRANCO, P F; FERNANDES, L A; MARQUES, R F D O; CUNHA, S C; PERFEITO, J. P. S. Regulação Brasileira em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. *Revista Fitos*, vol. 7 nº01, p. 5-16, 2012.

CHIPUK, J.E.; MOLDOVEANU, T.; LLAMBI, F.; PARSONS, M.J.; GREEN, D.R. The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*, v. 37, n. 12, p. 299-310, 2010.

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.

COLALTO C. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. *Phytotherapy research: PTR*, 32(3), 413–425, 2018.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, v. 26, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, v. 375, p. 183-193, 1996.

CRAGG M. G.; NEWMAN J. D. Natural products: A continuing source of novel drug leads; *Biochemical et Biophysica Acta*, v. 3, p. 3670–3695, 2013.

DARZYNKIEWICZ, Z., BEDNER, E., & SMOLEWSKI, P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in hematology*, 38(2), 179–193. 2001.



DE FLORA, S.; FERGUNSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*, v. 591, p. 8-15, 2005.

DHARMARAJ, S, 2015. The Basics: RT-PCR. Disponível em: <https://www.lifetechnologies.com/br/en/home/references/ambion-tech-support/rtpcr-analysis/general-articles/rt--pcr-the-basics.html>. Acesso em: 19 jul 2015.

EKHOL, S.V.; ZICKERT, P.; REED, S.L.; ZETTERBERG, A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol Cell Biol* 21: 3256-3265, 2001.

FALZON, C. C., A. & BALABANOVA. *Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. Primary care*, 44(2), 217–227, 2017.

FENECH M, MORLEY AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, v. 147(1-2), p. 29–36, 1985.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*, v. 600, p. 58-66, 2006.

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.

FINN, C.E. *Rubus spp., blackberry*. In: Janick, J., Paull, R.E. (Eds.), *The Encyclopedia of Fruits and Nuts*. CABI, Cambridge, MA, pp. 348–351, 2008

FRANGIONI, J.V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.7, p.626-634, 2003.



FREIMOSER, F. M. et al. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, p. 3727 – 3729, 1999

FRIEDBERG, E. C., WALKER, G. C., SIEDE, W., WOOD, R. D., SCHULTZ, R. A., AND ELLENBERGER, T. DNA Repair and Mutagenesis, 2nd ed. ASM Press, Washington D. C., USA. 2006.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quimica Nova*, v. 30 n. 2, p. 374-371, 2007.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G.V.; CHAND, P.. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 2015; 9(3):GE01-GE05. doi:10.7860/JCDR/2015/12062.5622.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.A.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v. 18, p. 45-51, 2003.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. *Phytochemistry Reviews*, v. 1, p. 275-285, 2002.

JAYAT, C.; RATINAUD, M.H. Cell cycle analyses by flow cytometry: principles and applications. *Biology of the cell*, v.78, p. 15-25, 1993

JOLY, A. B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 13 ed. São Paulo: Companhia Nacional, 2002.

JUNIOR, J.C. M.; FLORÃO, A.; MATTANA, F. V.R.; ROCHA, F. H.; SANTOS, C.A.M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* v.16, p.645-655. 2006.



KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J. & AHNSTROM, G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, v.363, p.89-96, 1995.

KUNEGUSUKU, M. Phytochemical, Antioxidant and Anticancer Activities of Extracts of Seven Fruits Found in the Southern Brazilian. v. 78, n. November 2014, 2016.

LI, X., PASCHE, B., ZHANG, W., & CHEN, K. Association of MUC16 Mutation With Tumor Mutation Load and Outcomes in Patients With Gastric Cancer. *JAMA oncology*, 4(12), 1691–1698, 2018.

LIU, Z., HUANG, R., ROBERTS, R., & TONG, W. Toxicogenomics: A 2020 Vision. *Trends in pharmacological sciences*, 40(2), 92–103, 2019.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. v. 88, p. 1515 – 1531, 2006.

MATIKAINEN, T.; PEREZ, G.I.; ZHENG, T.S.; KLUZAK, T.R.; RUEDA, B.R.; FLAVELL, R.A.; TILLY, J.L. Caspase-3 Gene Knockout Defines Cell Lineage Specificity for Programmed Cell Death Signaling in the Ovary. *Endocrinology*, v. 142, n. 6, p. 2468-2480, 2001.

MAURO, C. et al. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *Rubus rosaefolius* Sm. -Rosaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia Rev. Bras. Farmacogn*, v. 12, p. 23–25, 2002.

McKELVEY-MARTIN, V.J. et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat. Res.*, v. 288, p. 47-63, 1993.

MCKINNON K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11. 2008.

MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ, O., RADOVIĆ JAKOVLJEVIĆ, M., MARKOVIĆ, A., STANKOVIĆ, M., ĆIRIĆ, A., MARINKOVIĆ, D., & GRUJIČIĆ, D. Polyphenolic contents of *Teucrium polium* L. and *Teucrium scordium* L. associated with their protective effects against MMC-induced chromosomal damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi*, 42(2), 152–162, 2018.

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



NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, v. 17, p. 215– 234, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1022–1037, 2003.

NIERO, R., AND V. CECHINEL-FILHO. Therapeutic potential and chemical composition of Plants from the genus *Rubus*: A mini review of the last 10 years. *Nat. Prod. Commun.*3:437–44. 2008.

OECD. Organisation for economic co-operation and development. Harmonized integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures, 2001. Disponível em: < <http://www.oecd.org/dataoecd/48/51/37182285.pdf> > Acesso em: 07 set. 2007.

OECD. Organisation for economic co-operation and development. 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.

OECD. Organisation for economic co-operation and development. Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, 2010. Disponível em: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264091016-en>. Acesso em: 15 jul.2012.

OECD, T. G. 487. OECD guideline for the testing of chemicals. In vitro mammalian cell micronucleus test. 2016. Disponível em: <<https://www.oecd.org/chemicalsafety/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test-9789264264861-en.htm>> Acesso em: 10 out 2021.

ÖSTLING, O. & JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.123, p.291-298, 1984.

OSTROSKY, E. A. et al. *Rubus rosaefolius* extract as a natural preservative candidate in topical formulations. *AAPS PharmSciTech*, v. 12, n. 2, p. 732–7, 2011.



PANDA, A.; KRISHNA, S.N.; DADA, T.. Outcome of phacoemulsion in eyes with cataract and cornea opacity partially obscuring the pupillary area. *Nepal Journal of Ophthalmology*.v.4, p. 217-223, 2012.

PATEL,A.V.,Rojas-Vera,J.,Dacke,C.G..Therapeuticconstituentsandactionsof *Rubus* species. *Current Medicinal Chemistry*11,1501–1512,2004

PETREANU, M. et al. Uncommon trimethoxylated flavonol obtained from *rubus rosaefolius* leaves and its antiproliferative activity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 6–11, 2015.

PETREANU, M. Estudo fitoquímico e avaliação da ação biológica de três espécies da flora catarinense 2015.131f. Tese(doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós graduação em Ciências farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí,2017.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, v.30, p.1-10, 2002.

PIPERAKIS, S. M. Comet assay: A brief history. *Cell Biol Toxicol*, v. 25, p. 1-3, 2009.

POPOVIĆ, Z., MATIĆ, R., BOJOVIĆ, S., STEFANOVIĆ, M., & VIDAKOVIĆ, V. Ethnobotany and herbal medicine in modern complementary and alternative medicine: An overview of publications in the field of I&C medicine 2001-2013. *Journal of ethnopharmacology*, 181, 182–192, 2016.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol*, v. 281, p. 301-11, 2004.

QUADROS, A.P.O., L.M. ALMEIDA, M. PETREANU, R. NIERO, P.C.P. ROSA, A.C.H.F. SAWAYA, M.S. MANTOVANI, I.O.M. GAIVÃO AND E.L. MAISTRO. Risk assessment via genotoxicity, metabolism, apoptosis, and cell growth effects in a HepG2/C3A cell line upon treatment with *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves extract. *J. Toxicol. Environ. Health* 83: 495-508. 2020.



RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

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

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Ed.). *Mutagênese Ambiental*. 1ª ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2003

RISS, T. L.; *et al.* *Cell Viability Assays. Assay guidance Manual*. Bethesda, 2013.

ROGERO, S.O.; LUGAO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research, Sao Carlos*, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SAKUMI K. Germline mutation: de novo mutation in reproductive lineage cells. *Genes & genetic systems*, 94(1), 3–12, 2019. Disponível em <https://doi.org/10.1266/ggs.18-00055>

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Ed.). *Mutagênese Ambiental*. 1ª ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2003, p. 201-219.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagens and carcinogens. *Mutation Research*, v. 544, p. 99-106, 2003.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v.175, p.184-191, 1988.

SOUZA, P., T. BOEING, L. B. SOMENSI, C. C. CECHINEL-ZANCHETT, J. K. BASTOS, M. PETREANU, R. NIERO, V. CECHINEL-FILHO, L. M. SILVA, AND S. F. ANDRADE. Diuretic affect of extracts, fraction and two compounds 2 α ,3 β ,19 α -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid and 5-hydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone from *Rubus rosifolius* Sm. (Rosaceae) leaves in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 390 (4):351–60. doi:10.1007/s00210-016-1333-4, 2017.



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

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

TOLENTINO, F. et al. In vivo evaluation of the genetic toxicity of *Rubus niveus* Thunb. (Rosaceae) extract and initial screening of its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 164, p. 89–95, 2015.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol Educ*, v.29, n.3, p.151-159, 2005.

VALENTIN–SEVERIN *et al.* Use of HepG2 cell line for direct and indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research*, v. 536. p. 79-90, 2003.

VAN ENGLAND, M.; NEILAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, v.31, p.1-9, 1998.

VANGESTEL, C.; PEETERS, M.; MEES, G.; OLTENFREITER, R.; BOERSMA, H.H.; ELSINGA, P.H.; REUTELINGSPERGER, C.; VAN DAMME, N.; DE SPIEGELEER, B.; VAN DE WIELE, C. In vivo imaging of apoptosis in oncology: an update. *Molecular Imaging*, v.10, p.340-358, 2011.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. *Química de Produtos Naturais*. Itajaí: UNIVALI, 2014. p. 11-37.

ZHANG, L., HAN, X., & SHI, Y. Association of MUC16 Mutation With Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Solid Tumors. *JAMA network open*, 3(8), e2013201, 2020.



ZOR, M., & ASLAN, E. L. Assessment of In Vitro Antigenotoxic Effect of Nigella Sativa Oil. Turkish journal of pharmaceutical sciences, 17(1), 115–118, 2020.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. Quimica Nova, v. 33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.



4- ARTIGO 1

Artigo publicado em 22 Jun 2020 - *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*

<https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1779888>

Risk Assessment via Genotoxicity, Metabolism, Apoptosis and Cell Growth effects in a HepG2/C3A cell line upon treatment with *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves extract

Ana Paula Oliveira de Quadros^{a,b}, Laíza Moura Almeida^{c,h}, Marcel Petreanu^d, Rivaldo Niero^d, Paulo Cesar Pires Rosa^e, Alexandra Christinie Helena Frankland Sawaya^e, Mario Sergio Mantovani^f, Isabel O'Neill de Mascarenhas Gaivão^g, Edson Luis Maistro^{a,c,h}

^a São Paulo State University – UNESP – Biosciences Institute, Post-Graduate Program on General and Applied Biology, Botucatu, SP, Brazil

^b Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP – São José do Rio Preto, SP, Brasil

^c Marília Medical School, Marília, SP, Brazil

^d Vale do Itajaí University (UNIVALI), Department of Biological Sciences, Itajaí, SC, Brazil

^e Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

^f Londrina State University – UEL – Department of General Biology, Londrina, PR, Brazil

^g University of Trás-os-Montes and Alto Douro, CECAV and Department of Genetics and Biotechnology, Vila Real, Portugal

^h São Paulo State University – UNESP – Faculty of Philosophy and Sciences, Speech and Hearing Therapy Department, Marília, SP, Brazil

Running title: Genotoxicity of *Rubus rosifolius* leaf extract on HepG2/C3A cells.

Corresponding author: Prof. Dr. Edson Luis Maistro,

São Paulo State University – UNESP –

Faculty of Philosophy and Sciences,

Speech and Hearing Therapy Department,

Av. Hygino Muzzi Filho, 737. Caixa Postal 18. Campus Universitário.

CEP 17525-900 - Marília, SP – Brasil.

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



ABSTRACT

Rubus rosifolius Sm. (Rosaceae) is a plant traditionally used in Brazil and some other countries to treat diarrhea, stomach diseases, and as an analgesic, antimicrobial, antihypertensive, and as well as other pharmacological properties. The aim of this study was to examine the cytotoxic and genotoxic effects of *R. rosifolius* leaves extract on HepG2/C3A cells and correlate these findings with expression of mRNA to underlying mechanisms of action. At concentrations between 0.01 and 100 $\mu\text{g/ml}$, cytotoxic effects were not detected by the MTT assay. This was confirmed by mRNA induction of the CYP3A4 gene (by RT-qPCR assay). However, genotoxic effects occurred at treatments from 1 $\mu\text{g/ml}$ extract (comet and micronucleus test). An increase in the number of cells in S phase was observed at 100 $\mu\text{g/ml}$, and an elevation in apoptotic cell number was found for all tested concentrations (10, 20 or 100 $\mu\text{g/ml}$) (cell cycle and apoptosis analysis by flow cytometry). The genotoxicity induced by the extract was the main cause of the rise in number of cells undergoing apoptosis, as indicated by the increase in the mRNA of CASP7 gene, and elevation of cells in the S phase of the cell cycle at the higher tested concentrations, as an attempt to repair genetic damage that occurred. These observations suggest that, despite its pharmacological potential, the use of *R. rosifolius* leaves extract may pose a risk to the integrity of the genetic material of human cells.

KEYWORDS: cell cycle; gene expression; genotoxicity; apoptosis; cytotoxicity; Rosaceae toxicity; comet assay.



Introduction

Herbal medicine has been used since ancient times in search of nature's answers to human diseases (Majolo et al. 2020; Bourhia et al. 2019; Tuttis et al. 2018). The use of oils and infusions serves as a basis for pharmaceutical research using isolated or combined plants (Orlando et al. 2019; Freitas et al. 2020; Tariq et al. 2019). Studies showed that approximately 80% of the population in developing countries are dependent upon plants in primary health care, and more than 25% of prescription drugs worldwide are derived directly or indirectly from plants, with 11% being on the list of essential medicines according to the World Health Organization (Newman et al. 2000; Hostettmann and Marston 2002). Despite the widespread use of plants in traditional medicine, and their great potential as a source of new drugs, comprehensive investigations were not fully undertaken, since there are approximately 300,000 species of plants on the planet, and only 15% have been studied phytochemically and 6% pharmacologically (Cragg and Newman 2013).

The *Rubus* genus comprises of approximately 715 species divided into 12 subgenera which are found on all continents except Antarctica. These plants have been cultivated for centuries, mainly for consumption of their fruits, but other parts were also utilized for medicinal purposes due to large quantities of tannins (Patel et al. 2004; Finn et al. 2008; Alves et al. 2014; Tolentino et al. 2015).

Rubus rosifolius Smith (syn. *Rubus rosaefolius* Smith) is a plant of the Rosaceae family, popularly found under the names "blackberry", "roseleaf raspberry", "roseleaf bramble", "raspberry-bush", among others. It is a medium-sized shrub, reaching up to 5 m (Kanegusuku et al. 2007). This species is native to Solomon Islands, New Caledonia, and Vanuatu, in the eastern coastal regions of Australia, and to Mauritius, in the southernmost region of Indonesia and Indochina, and also in Taiwan and China (Francis 2004; USDA-ARS 2014). In other countries as Central and South America, Mexico, Africa, the West Indies and on many islands in the Pacific Ocean, it was naturalized (Acevedo-Rodríguez and Strong 2012; Davidse et al. 2014; PIER 2014; PROTA 2014).

Aboriginal population in Australia used a decoction of the leaves of *R. Rosifolius* as a traditional treatment for diarrhea (Symons and Symons 1994; Francis 2004; BioNET-EAFRINET 2014; PROTA 2014). In Madagascar, the ethnomedicinal use of its leaves as



reported for stomach diseases (Rakotoarivelo et al. 2015). Leaves might utilized in tea, which might helpful for painful menstruation, childbirth, flu, and morning sickness. Regarding fruits, these are very sweet and perfectly edible, and may be prepared in preserves, pies and (Rakotoarivelo et al. 2015). In Argentina, *R. rosifolius* is traditionally used as dessert fruit with cream and sugar jam by migrants in Misiones region (Kujawska and Luczaj 2015). The fruit, if eaten in large quantities exhibits laxative properties. The species is also widely planted as an ornamental plant (Francis 2004; BioNET-EAFRINET 2014; PROTA 2014).

The medicinal use of *R. rosifolius* aroused pharmaceutical interest due to scientific confirmation of the following properties analgesic (Kanegusuku et al. 2007), antimicrobial (Mauro et al. 2002; Ostrosky et al. 2011), antiproliferative (Petreanu et al. 2015), antioxidant (Bagattoli et al. 2016), diuretic (Souza et al. 2017), gastroprotective and antidepressant effects (Petreanu 2017).

Cytotoxicity and genotoxicity studies of plant extracts and their main constituents have contributed to the determination of their biological properties as well as establishment of their safety for use in humans (Yesil-Celiktas et al. 2010; Yonekubo et al. 2018; Almeida et al. 2020). Some national and international regulatory and inspection agencies use the data derived from in vitro cytotoxic and genotoxic assays as preclinical safety data (U.S. Food and Drug Administration 2012; Guo et al. 2020). Previous studies of genetic toxicity assessment were conducted only on two other species of plants of the genus *Rubus* that have been used in folk medicine, *R. imperialis* and *R. niveus* (Alves et al. 2014; Tolentino et al. 2015). The in vivo tests using the extract of aerial parts of these species demonstrated aneugenic/clastogenic effects at higher doses of the extracts, making it essential to further explore the potential toxicity of this group of plants.

In view of the following factors: 1) Considering that scientific community encourages alternative methods as in vitro studies to reduce, refine, and replace (3Rs) animals used in experiments, aimed at protecting animal welfare (Araújo et al. 2014); 2) that liver receives a large amount of blood drained from the digestive tract through the portal vein, its metabolism function, and because of that it is one of the first organs showing the impacts of toxic compounds (Ferreira et al. 2012; Marques et al. 2019); 3) medicinal potential of different species of the genus *Rubus*; 2) the genetic damage induced by extracts of the aerial parts of two *Rubus* species; and 3) lack of studies investigating the genotoxicity of *R. rosifolius*, the present study was conducted with the objective of examining the influence of the leaf extract



of this plant on the cell cycle, apoptosis, metabolism, toxicity and DNA damage using HepG2/C3A human hepatoma cultured cells.

Materials and methods

Plant material

The *R. rosifolius* plant material was collected in the town of Itajaí, SC, Brazil (26° 54' 28" S; 48° 39' 43" W) in March 2013 and identified by Dr. Ademir Reis (Botanical Department of the Federal University of Santa Catarina, Brazil). A voucher specimen was deposited at the Barbosa Rodrigues Herbarium (Itajaí-SC) under number V.C. Filho 035. Air-dried powdered leaves (580 g) of *R. rosifolius* were exhaustively extracted with methanol (MeOH) at room temperature for 7 days. The macerates were filtered and concentrated under reduced pressure in a rotatory evaporator, yielding 174 g of crude methanol extract. At the end of the extraction period, the material was filtered and extractive solution concentrated in a rotary evaporator with reduced pressure to eliminate the solvent, and then dried in an oven with circulating air at 40 °C. After drying, the crude methanolic extract (EMB) was kept in a desiccator with activated silica until use.

Extract characterization - Chromatography - Mass Spectrometry

The analysis was performed using a Waters UPC® Acquity Chromatograph and a triple-quadrupole mass spectrometer (Waters-TQD-Acquity).

Method and conditions

Sample solution, prepared from 0.2 g of leaf were dissolved in methanol/water 50:50 v/v, was filtered on 0.45 µm PVDF membrane and injected into the chromatographic system.

- Chromatographic conditions:

Chromatograph UPLC® Acquity Waters

Column C18 BEH Acquity Waters (1.7 µm x 2.1 mm x 50 mm)

Oven temperature: 40 °C

Injection volume: 10 µl

The elution was carried out by gradient mode, with flow of 250 µl/min, using as mobile phase A-purified water (Milli-Q) with 0.1% formic acid and as mobile phase B-acetonitrile (chromatographic grade), as described in Table 1.

- Mass spectrometer conditions



A triple-quadrupole mass spectrometer (Waters' TQD-Acquity) with electrospray ionization (ESI) was used to perform negative mode scanning under the following conditions: capillary of ± 4 kV, ± 30 V cone, extractor of 2 V, source temperature of 150 °C and desolvation temperature of 300 °C.

Chemicals

The *Rubus rosifolius* leaves extract was diluted in Tween 80 1% for testing in HepG2/C3A human hepatoma cells (acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank (RJCB-Brazil)), and cultured in DMEM/High glucose medium (Hyclone GE Life Sciences), with addition of fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotic (Penicillin G/Streptomycin/Amphotericin B (Hyclone)). In the molecular biology part, the following kits were used RNeasy Kit (Qiagen), TRIzol and RNase A (Thermo Fisher Scientific), and Annexin red kit (Merck-Millipore) Other chemicals, commonly used in genotoxicity assays, were normal-melting point (NMP) and low-melting point (LMP) agarose (Invitrogen), dimethyl sulfoxide (DMSO), Triton X-100 (J. T. Baker), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck), trypsin (Sigma-Aldrich), cytochalasin-B (Sigma-Aldrich). The dyes used were trypan blue and Giemsa (Synth). Doxorubicin (Adriblastin®, Wyeth) and benzo(a)pyrene (Sigma-Aldrich), known DNA damage inducers, were employed as positive control groups.

Cell culture

Human hepatoma cells (HepG2/C3A) was cultured in DMEM with pyruvate and L-glutamine, supplemented with 10% FBS (Gibco®) and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin (Hyclone®). Cells were maintained in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C. Under these conditions, the duration of the cell cycle is approximately 24 hr. After cells were placed in culture flasks, they were cultured for 24 hr, prior to start of all experiments. The cells were unfreezed in passage 11. All experimental conditions was performed within a range of 4-5 passages of the cells.

Cytotoxicity analysis

Cytotoxicity of *R. rosifolius* extract in HepG2/C3A cells was determined using the MTT assay as described by Mosmann (1983), with some modifications. A total of 1×10^4 cells were placed in each well of a 96-well plate. After stabilization, the culture medium was discarded and 100 μ l complete medium was added to control (Tween 80 at 1%) and treatments. Treatments included the cytotoxic agent (Triton X-100 1%) and *R. rosifolius* extract at 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 or 100 μ g/ml (maximum concentration that was able to



dissolve in the vehicle used (Tween 80 at 1%). After 24, 48 or 72 hr incubation, the culture medium was replaced per 100 μ l culture medium, plus MTT (0.2 mg/ml). The plate was incubated for another 4 hr before discarding the medium containing MTT, followed by the addition of 100 μ l DMSO for solubilization. The absorbance was read on a microplate spectrophotometer (Epoch - Biotek) at 550 nm. Cell viability was estimated based upon absorbance of control (Abstreatment/Abscontrol x 100). The experiments were carried out in triplicate.

Genotoxicity test (Comet assay)

The comet assay was performed on HepG2/C3A cells aiming to assess the potential of *R. rosifolius* extract in inducing genetic damage (Tice et al. 2000; Collins et al. 2008). Cells were seeded in 6-well plates at 2×10^5 cells/ml for 24 hr. Since none of the concentrations tested by the MTT assay caused a decrease in cell viability, all six concentrations of the *R. rosifolius* extract were selected for the genotoxicity evaluation, namely 0.01, 0.1, 1, 10, 20 or 100 μ g/ml. The higher concentration choosed (100 μ g/ml) is equivalent to an intake of 500 mg of extract by a human weighing 70 Kg. The detailed methodology using the comet assay, microscopic analysis of the nucleoids and classification of DNA damage is the one described by Maistro et al. (2019). Doxorubicin, at 2 μ M, was used as positive control. Tween 80 at 1% was used as a negative control. Experiments were conducted in triplicate.

Clastogenicity/aneugenicity assay (Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) test)

The CBMN assay was performed as described by Fenech (2000) and with the recommendations from OECD 487 (2014). HepG2/C3A cells (in triplicate) were incubated with extract at 0.01, 0.1, 1, 10, 20 or 100 μ g/ml. Tween 80 at 1% used as negative control and benzo(a)pyrene (2 μ M) was used as positive control. The detailed description of the methodology is presented in Maistro et al. (2019).

The cells with micronuclei (MN), the nucleoplasmic bridges (NPB), and the nuclear buds (NB) were scored, using the standard criteria presented by Fenech (2000; 2006). One thousand binucleated cells for each culture flask were scored on coded slides using an optical microscope (Primo Star, Zeiss) at 100x magnification. Nuclear Division Index (NDI) was calculated for each culture, as: $NDI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$, where M1-M4 indicates the number of cells with 1-4 nuclei assessed in 500 cells by culture flask (N) (Eastmond and Tucker 1989). This index was used as a measure of cytotoxicity.

Cell cycle and apoptosis analysis by flow cytometry



Six-well plates were used to seed HepG2/C3A cells (7.2×10^5 cells/well). In both analyses (cell cycle and apoptosis), cells were treated with 10, 20 or 100 $\mu\text{g/ml}$ of leaf extract for 24 hr. Three independent experiments were performed. The complete methodology used in these two assays is described by Crippa et al. (2020).

RT-qPCR.

To determine changes in gene expression patterns of HepG2/C3A cells, exposed for 12 hr to the extract, at a concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$, Real-time PCR was performed. Table 5 contains a list of the primers (Sigma-Aldrich, cat.no. KSPQ12012) employed to make multiple copies of the genes involved in apoptosis (CASP3, CASP7, BBC3 and BCL2), autophagy (BECN1), cell cycle (TP53, TRAF2, CDKN1A, mTOR, MYC and NFKB) and xenobiotic metabolism (CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 and CYP2E1). A total of 1×10^6 cells/well were seeded in six-well plates. GAPDH was used as a reference gene. The complete protocol that was performed is described according to Biazi et al. (2017).

Statistical analysis

Each assay was performed in triplicate. Statistical analysis was performed with analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's and/or Tukey's post-test using GraphpadPrism® 5 software. The real-time PCR data were analyzed using the REST program. When relative gene expression level was ≤ 0.5 or ≥ 2 , a significant difference was considered. LinRegPCR program was utilized to calculate the efficiency of the reactions. For all tests, the differences were considered statistically significant at a p-value ≤ 0.05 .

Results

The compounds niga-ichigoside (A), quercetin glucuronide (B), tormentic acid (C), and 5,7-dihydroxy- 6,8,4'-trimethoxyflavonol (D), were the main compounds identified in the leaves extract of *R. rosifolius* (data presented in supplementary material). They were identified by comparison of their MS/MS fragmentation with data from literature (Alves et al., 2014; Tolentino et al., 2015). The presence of 5,7-dihydroxy- 6,8,4'-trimethoxyflavonol was reported in *Rubus rosifolius* extracts, but its MS/MS was not included (Pittarello et al., 2019). However, the retention time and fragmentation pattern are indicative of a methoxy flavonoid with consecutive losses of 15 Da ($-\text{CH}_3$) (data not shown).

The results of the cell viability test of *R. rosifolius* leaf extract at concentrations between 0.01 and 100 $\mu\text{g/ml}$ (at exposure times of 24, 48 and 72 hr) did not markedly affect cell viability in HepG2/C3A cells by the MTT test compared to negative control (Figure 1).



As the principle of the MTT method is based upon verifying the viability of cells based upon by metabolizing capacity (Mosmann, 1983), in HepG2/C3A cells treated with leaf extract an increase in metabolism of formazan salt was noted, which accounted for cell viability being greater than 100% compared to control. As expected, only Triton X-100, used as a positive control, resulted in a significant reduction in cell viability in HepG2/C3A cells with or without metabolism.

The results of the evaluation of the genotoxic potential of *R. rosifolius* leaf extract in HepG2/C3A cells by the comet assay are shown in Table 2. Concentrations of 1, 10, 20 or 100 µg/ml significantly increased DNA damage in cells in relation to negative control. The rise in DNA damage was not directly proportional to the increase in the tested concentrations. At these 4 concentrations, most of the DNA damage observed was class 1, indicating the occurrence of little DNA damage in these cells. The group of cells treated with doxorubicin, used as a positive control, also exhibited a significant elevation in DNA damage compared to negative control, confirming the efficiency of this technique in detecting cellular DNA damage.

The results of the determination of clastogenic/aneugenic potential of *R. rosifolius* leaf extract in human leukocytes are presented in Table 3. At the highest tested concentration 100 µg/ml mutagenicity was noted as evidenced by significant increase in number of binucleated cells with MN compared to negative control. In the cells treated with 20 or 100 µg/ml extract, there was also a significant elevation in binucleated cells with nucleoplasmic bridges and/or nuclear buds in relation to control. As expected, the positive control induced a marked rise in cells with MN, nucleoplasmic bridges and nuclear buds, confirming the sensitivity of the CBMN test.

Cell cycle analysis showed that extract treatment (24 hr) promoted a significant increase in number of cells in S phase and decrease in number of cells in G2/M phase only at 100 µg/ml extract. The other concentrations yielded no significant changes in comparison with the respective control vehicle (Figure 2).

Figure 3 illustrates the apoptosis data by flow cytometry after 24 hr incubation with test extract. The three concentrations tested yielded significant changes in the number of viable cells and number of cells undergoing apoptosis, comparing with respective vehicles control. The % apoptotic cells increased at higher concentrations of the extract tested.



Table 4 shows gene expression analysis by RT-qPCR. In HepG2/C3A cells., Data demonstrated that treatment with 20 $\mu\text{g/ml}$ *R. rosifolius* extract produced a significant increase of 2.86-fold in CASP7 mRNA expression and 2.15-fold in CYP3A4 mRNA expression. In contrast, a significant decrease of 2-fold and 3.12-fold in the mRNA expression of genes CYP1A2 and CYP2C19, respectively was found. Extract treatment did not markedly alter gene expression of the remaining genes investigated.

Discussion

Several studies with extracts of *Rubus rosifolius* and its constituents reported therapeutic effects, such as: analgesic, antimicrobial, antiproliferative, antioxidant, diuretic, gastroprotective and antidepressant (Mauro et al. 2002; Petreanu et al. 2015; Bagattoli et al. 2016; Souza et al. 2017; Petreanu 2017). However, data on the cytotoxic and genotoxic potential, as well as general mechanisms of action of toxicity of leaf and stem extracts, are still apparently scarce.

Data obtained by the MTT test indicated that the extract did not markedly affect cell viability. The results even showed an increase in % viable cells compared to cells that were not exposed to the extract, which may be attributed to enhanced metabolism of formazan salt. This finding is conceivable due to a significant increase in expression of the CYP3A4 gene in these human hepatoma cells, an index of stimulated metabolism. Only a single in vitro published study evaluating the cytotoxicity of another plant extract of the *Rubus* genus was found. Kreander et al. (2006) observed similar results for the extract of *R. idaeus*, where these investigators verified the absence of cytotoxicity in human colorectal epithelial adenocarcinoma cells (Caco-2). Other studies evaluating the cytotoxicity of *Rubus* plant extracts available were conducted in vivo. Alves et al. (2014) reported the absence of cytotoxicity of the extract of *R. imperialis* based upon analysis of the ratio of polychromatic erythrocytes and normochromatic erythrocytes of the bone marrow of Swiss mice. Similar findings were noted by Tolentino et al. (2015) for the extract of *R. niveus*. Both aforementioned in vivo studies confirm the lack of cytotoxicity observed in the present in vitro experiment for *R. rosifolius*.

Alves et al. (2014) when using the MN test to assess clastogenic/aneugenic effects of the extract of *R. imperialis*, showed significant clastogenic/aneugenic effects in the polychromatic erythrocytes of animals treated with doses of 250 or 500 mg/kg extract. Similarly, Tolentino et al. (2015) found that the highest dose of 2000 mg/kg *R. niveus* extract



significantly increased micronucleated polychromatic erythrocytes in mice. In the present study, *R. rosifolius* extract produced genetic damage detected by the comet assay but not detected by the micronucleus test. It is not uncommon, because the comet assay detects single and double strand breaks of DNA (Tice et al. 2000), which can be repaired by the cell, while the micronucleus test detects chromosomal breaks or effects on chromosome segregation in anaphase (Fenech 2000), so they are complementary tests that detect different damages to the genetic material. These results show the importance of the association of this both assays in assessing genetic toxicity, as recommended by investigators in this area, since different genotoxins display different modes of action (Bowen et al. 2011; Dusinska et al. 2019). Similar effects was reported by Maistro et al. (2019) for the extract of *Salix alba*, and by Souza et al. (2020) analyzing the genotoxic potential of the monoterpene citral, isolated from the extract of *Cymbopogon citratus*, among several other examples found in the literature.

The genotoxicity observed in species of the genus *Rubus* may be related to the presence of some major compounds in the extracts that are common among these plants. A thorough chemical characterization comparing the plant extracts of these species can verify this hypothesis.

The experiments using flow cytometry revealed that the leaf extract did not induce significant changes in % cells in different phases of the cell cycle, except for the concentration of 100 µg/ml which significantly increased % cells retained in the S phase. This was correlated with DNA damage and repair mechanisms acting to protect cell integrity. In the apoptosis analyses, there was a significant rise in % cells with total apoptosis at three concentrations analyzed, which might correlated with elevation in relative expression of the CASP7 gene, involved in cell apoptosis. Although the vehicle control at the highest concentration of 100 µg/ml displayed increased apoptosis, the vehicle controls at the two lower concentrations did not show such toxicity. At present the basis for enhanced apoptosis at 100 µg/ml is not known but may have been due to interference with cellular functions at this concentration and indicates that this vehicle concentration should not be used. In contrast this vehicle control concentration in the MTT test did not affect cell viability. It is possible that another type of cell death, which does not involve mitochondrial inactivity and/or detoxifying enzymes of the smooth endoplasmic reticulum, is occurring in the cells after treatment with concentration of 100 µg/ml *R. rosifolius* extract.



Apoptosis is an ordered program of cellular suicide that is fundamental to the development and homeostasis of multicellular organisms (Kerr et al. 1972; Duvall and Wyllie 1986). This phenomenon occurs following characteristic morphological changes that are dependent upon the activity of caspases. Caspases are cysteine proteases with specific cleavage activity after formation of aspartic acid residues (Salvesen 2002; Riedl and Shi 2004). Because these proteins are the executors of apoptosis, they are the key parts in apoptotic cell death. Considering that *R. rosifolius* leaf extract produced an interference in the cell cycle, by increasing % cells in the S phase, it is plausible to suppose that the extract genotoxicity demonstrated by the comet assay may be responsible for this interference in the cell cycle of HepG2/C3A cells and, given the failure to repair DNA damage in a significant % in these cells, the process of apoptosis occurred, as evidenced by rise in the relative expression of the CASP7 gene. Other studies have established the relationship between increase levels of genetic instability and DNA damage in cells, and apoptosis induction (Gholami et al. 2014; Alinejad-Mofrad et al. 2019).

Another gene that exhibited enhanced relative expression was CYP3A4. This gene together with the CYP2D6 gene, are responsible for the biotransformation of 70-80% of all medicines for clinical use (Zanger and Schwab 2013). Thus, the metabolism of *R. rosifolius* leaf extract, indicated by the increased expression of the CYP3A4 gene, may have resulted in formation of genotoxic by-products, evidenced by the positive genotoxicity findings in the comet assay. This postulation is supported by the fact that most genotoxic compounds are active only after metabolism by liver enzymes (Cooper and Porter 2000). On the other hand, a significant decrease was detected in the expression of the CYP1A2 and CYP2C19 genes. This fall is interesting because previously Xu et al. (2005) reported the induction of the expression of genes related to drug and xenobiotics metabolism is expected in the cells and/or organisms exposed to exogenous compounds. Data indicate that this pathway of metabolism needs to be better investigated in cells exposed to the extract of leaves of *R. rosifolius*.

Phytochemical analyses of *Rubus rosifolius* leaf extract performed in the present study showed the presence of niga-ichigoside, quercetin glucuronide, tormentic acid, and 5,7-dihydroxy- 6,8,4'-trimethoxyflavonol as main compounds. Chemical analysis performed by other investigators by different methods revealed the presence of anthraquinone heterosides (C-heteroside), free anthraquinones, saponins, tannins, flavonoids, alkaloids, reducing sugars and cardioactive heterosides (Mauro et al. 2002). Among the substances found, three major



compounds stand out: an unusual methoxylated flavonoid 5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavonol (Petreanu et al. 2015), flavone 5-hydroxy-3,6,7, 8,4-pentamethoxyflavone and tormentic acid (Niero and Cechinel-Filho 2008). Two of these were confirmed in the present study (5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavonol, and tormentic acid). Petreanu et al. (2015) reported that the hexane, dichloromethane and ethyl acetate fractions of *R. rosifolius* leaf extract, as well as the major compound 5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavonol, showed antiproliferative effect in 8 human cancer cell lines. It is possible that the genotoxic effect observed in the present study in human hepatocarcinoma cells followed by a delay in the cell cycle and induction of apoptosis, are involved with the antiproliferative action of *R. rosifolius* leaf extract.

In view of the experimental conditions developed in the present study, it may be concluded that the extract of leaves of *R. rosifolius* displays genotoxic effects in HepG2/C3A cells (human hepatocarcinoma). Complementary cytotoxicity analyses by flow cytometry showed that the higher concentration of the extract produced interference in the cell cycle of HepG2/C3A cells, with a significant % cells stopping in S phase, as well as an elevation in % apoptotic cells at all tested concentrations. This increase in apoptotic cell number as evidenced by enhanced expression of the CASP7 gene, may be related to the significant increase in DNA damage observed in these cells. Despite the promising therapeutic potential of *R. rosifolius* leaf extract, data obtained suggest caution in its use, given the cellular and genetic toxicity noted in the present study in human cells, and the need for further studies in relation to the observed toxicity with this plant and other species of the same genus.

Funding

This research was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grant: 2017/24149-4); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and by the project UID/CVT/00772/2020 supported by the Portuguese Science and Technology Foundation (FCT).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



Credit authorship contribution statement

A.P.O. Quadros: Investigation, Methodology, Writing original draft. L.M. Almeida: Methodology. M. Petreanu, R. Niero: extract obtention. P.C.P. Rosa, A.C.H.F. Sawaya: extract chemical characterization. M.S. Mantovani: RT-qPCR, flow cytometry Methodology, Writing review. I.O.M. Gaivão: Language revision, Writing review. E.L. Maistro: Conceptualization, Supervision, Resources, Funding, Writing review and editing.

References

- Acevedo-Rodríguez, P., and M.T. Strong. 2012. Catalogue of the Seed Plants of the West Indies. Smithsonian Contributions to Botany, 98:1192 pp. Washington DC, USA: Smithsonian Institution. <http://botany.si.edu/Antilles/WestIndies/catalog.htm>
- Alinejad-Mofrad, B. Malaekheh-Nikouei, L. Gholami, S.H. Mousavi, H.R. Sadeghnia, M. Mohajeri, M. Darroudi, and R.K. Oskuee. 2019. Evaluation and comparison of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptotic effects of poly-L-lysine/plasmid DNA micro- and nanoparticles. *Hum. Exp. Toxicol.* 38: doi.org/10.1177/0960327119846924
- Almeida, T.S., M.R. Arantes, J.J. Lopes-Neto, T.M. Souza, I.P. Pessoa, J.L. Medeiros, P.M.S. Tabosa, T.B. Moreira, D.F. Farias, and A.F.U. Carvalho. 2020. Evaluation of Seeds Ethanolic Extracts of *Triplaris gardneriana* Wedd. Using in vitro and in vivo Toxicological Methods. *J. Toxicol. Environ. Health A* 83: 135-152.
- Alves, A.B.C.R., R.S. Santos, S.S. Calil, R. Niero, J.S. Lopes, F.F. Perazzo, P.C.P. Rosa, S.F. Andrade, V. Cechinel-Filho, E.L. Maistro. 2014. Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract in vivo and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. *J. Ethnopharmacol.* 153: 694-700.
- Araujo G.L., M.A.A. Campos, M.A.S. Valente, S.C.T. Silva, F.D. França, M.M. Chaves, and C.A. Tagliati. 2014. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Braz. J. Pharm. Sci.* 50: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>
- Bagattoli, P.C., D.D. Cipriani, L.N. Mariano, M. Correa, T.M. Wagner, V.F. Noldin, V. Cechinel-Filho, and R. Niero. 2016. Phytochemical, antioxidant and anticancer activities of extracts of seven fruits found in the southern Brazilian Flora. *Indian J. Pharm. Sci.* 78: 34-40.



- Biazi, B.I., G.F.R. D'Epiro, T.A. Zanetti, M.T. Oliveira, L.R. Ribeiro, and M.S. Mantovani. 2017. Risk assessment via metabolism and cell growth inhibition in a HepG2/C3A cell line upon treatment with Arpadol and its active component Harpagoside. *Phytother. Res.* 31:387-394.
- BioNET-EAFRINET. 2014. East African Network for Taxonomy. Online Key and Fact Sheets for Invasive plants. <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/index.htm>
- Bourhia, M., F.E. Laasri, H. Aourik, A. Boukhris, R. Ullah, A. Bari, S.S. Ali, M.E. Mzibri, L. Benbacer, and S. Gmouh. 2019. Antioxidant and antiproliferative activities of bioactive compounds contained in *Rosmarinus officinalis* used in the mediterranean diet.....*Evid based Complement Alternat Med* 2019:7623830.
- Bowen, D.E., J.H. Whitwell, L. Lillford, D. Henderson, D. Kidd, S. Mc-Garry, G. Pearce, C. Beevers, and D.J. Kirkland. 2011. Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. *Mutat. Res.* 722: 7-19.
- Collins, A.R., A.A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovanelli, M. Kruszewski, C.C. Smith, and R. Stetina. 2008. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis* 23: 143-151.
- Cooper, M.T., and T.D. Porter. 2000. Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* coexpressing human cytochrome P450 2E1 and reductase. *Mutat. Res.* 6: 45-52.
- Cragg, G.M., and D.J. Newman. 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830: 3670-3695.
- Crippa, G.V., T.A. Zanetti, B.I. Biazi, A. Baranoski, L.A. Marques, G.C. Coatti, S.R. Lepri, and M.S. Mantovani. 2020. Up and down-regulation of mRNA in the cytotoxicity and genotoxicity of plumbagin in HepG2/C3A. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 75: 103328.
- Davidse, G., M. Sousa, S. Knapp, and F. Chiang. 2014. Saururaceae a Zygophyllaceae. *Flora Mesoamericana* [ed. by Davidse, G. \Sousa, M. \Knapp, S. \Chiang, F.], Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dusinska, M., E. Mariussen, E. Runden-Pran, A.M. Hudecova, E. Elle, A. Kazimirova, N. El-Yamani, N. Dommershausen, J. Tharmann, D. Fieblinger, F. Herzberg, A. Luch, and A.



- Haase. 2019. In vitro approaches for assessing the genotoxicity of nanomaterials. *Meth Mol. Biol.* 1894: 83-122.
- Duvall, E., and A.H. Wyllie. 1986. Death and the cell. *Immunol. Today* 7: 115-119.
- Eastmond, D.A. and J.D. Tucker. 1989. Identification of Aneuploidy-Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Antikinetochore Antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13: 34-43.
- Fenech, M. 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* 600: 58-66.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455:81-95.
- Ferreira, M., P.R. Oliveira, S.E. Denardi, G.H. Bechara, and M.I. Mathias. 2012. Action of the chemical agent fipronil (active ingredient of acaricide Frontline®) on the liver of mice: an ultrastructural analysis. *Microsc. Res. Tech.* 75: 197-205.
- Finn, C., B.M. Yorgey, B.C. Strik, and R. Martin. 2008. New USDA-ARS blackberry cultivars bring diversity to the market. *Acta Horticulturae* 777: .
Doi:10.17660/ActaHortic.2008.777.8
- Francis, J.K. 2004. Wildland shrubs of the United States and its Territories: thamnisc descriptions: volume 1. General Technical Report - International Institute of Tropical Forestry, USDA Forest Service, No.IITF-GTR-26: 830 pp
- Freitas, P.R., P.R. Freitas, A.C.J. Araújo, C.R.S. Barbosa, D.F. Muniz, J.E. Rocha, J.B. Araújo-Neto, M.M.Costa Silva, R.L.S. Pereira, L.E. Silva, W. Amaral, C. Deschamps, S.R. Tintino, J. Ribeiro-Filho, and H.D.M. Coutinho. 2020. Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. *Microb Pathog.* 145: 104223
- Guo, X., J.E. Seo, X. Li, and N. Mei. 2020. Genetic Toxicity Assessment Using Liver Cell Models: Past, Present, and Future. *J. Toxicol. Environ. Health B* 23: 27-50
- Hartmann, A., and G. Speit. 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 90:183-188.
- Gholami, L, H.R. Sadeghnia, M. Darroudi. 2014. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity induced by different molecular weights of polyethylenimine/DNA nanoparticles. *Turkish J. Biol.* 38: 380–387.
- Hostettmann, K., and A. Marston. 2002. Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochem. Rev.* 1: 275-285.



- Kanegusuku, M., D. Sbors, E.S. Bastos, M.M. Souza, V. Cechinel-Filho, R.A. Yunes, F.D. Monache, and R. Niero. 2007. Phytochemical and analgesic activity of extract, fractions and a 19-hydroxyursane-type triterpenoid obtained from *Rubus rosifolius* (Rosaceae). *Biol. Pharm. Bull.* 30: 999-1002.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
- Kreander, K., A. Galkin, S. Vuorela, P. Tammela, L. Laitinen, M. Heinonen, and P. Vuorela. 2006. In-vitro mutagenic potential and effect on permeability of co-administered drugs across Caco-2 cell monolayers of *Rubus idaeus* and its fortified fractions. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 1545-1552.
- Kujawska, M., and L. Luczaj. 2015. Wild edible plants used by the polish community in Misiones, Argentina. *Human. Ecol.* 43: 855-869.
- Maistro, E.L., P.M. Terrazas, F.F. Perazzo, I.O.M. Gaivão, A.C.H.F. Sawaya, and P.C.P. Rosa. 2019. *Salix alba* (white willow) medicinal plant presents genotoxic effects in human cultured leukocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 82: 1223-1234.
- Majolo, F., S. Bitencourt, B.W. Monteiro, G.V. Haute, C. Alves, J. Silva, S. Pinteus, R.C.V. Santos, H.F.V. Torquato, E.J. Paredes-Gamero, J.R. Oliveira, C.F.V. Souza, R.F.P. Pedrosa, S. Laufer, and M.I. Goettert. 2020. Antimicrobial and antileukemic effects: in vitro activity of *Calyptanthes grandifolia* aqueous leaf extract. *J. Toxicol. Environ. Health A* 83: 289-301. doi.org/10.1080/15287394.2020.1753606
- Marques, E.S., J.G. Froder, P.R. Oliveira, F.F. Perazzo, P.C.P. Rosa, I.O.M. Gaivão, M.I.C. Mathias, and E.L. Maistro. 2019. Cytotoxic effects of *Euterpe oleraceae* fruit oil (açai) in rat liver and thyroid tissues. *Braz. J. Pharmacog.* 29: 54-61.
- Mauro, C., C.M.Z. Cardoso, P.S. Lopes, E.M.C. Marcondes, J.P. Miranda, M. Frota, and A.L. Pacheco. 2002. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *R. rosifolius* Sm., Rosaceae. *Rev. Bras. Farmacog.* 12: 23-25.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* 65: 55-63.
- Newman, D.J., G.M. Cragg, and K.M. Snader. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 17: 215-234.



- Niero, R., and V. Cechinel-Filho. 2008. Therapeutic Potential and Chemical Composition of Plants from the Genus *Rubus*: A Mini Review of the Last 10 Years. *Nat. Prod. Commun.* 3:437-444.
- OECD, TG 487. 2014. OECD guideline for the testing of chemicals. In vitro mammalian cell micronucleus test. Available at: <http://oecd.org/env/ehs/testing/TG487Oct2012update29oct.pdf>
- Orlando, J.B., B.O. Silva, C.L. Pires-Cunha, C.A. Hiruma-Lima, I.O.M. Gaivão, and E.L. Maistro. 2019. Genotoxic Effects Induced by Beta-Myrcene Following Metabolism by Liver HepG2/C3A Human Cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* 82: 176-185
- Ostrosky, E.A., E.M. Marcondes, and S.O. Nishikawa. 2011. *Rubus rosifolius* extract as a natural preservative candidate in topical formulations. *Pharm Sci Tech.* 12: 732-737.
- Patel, A.V., J. Rojas, and C.G. Dacke. 2004. Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. *Cur. Med. Chem.* 11:1501-1512.
- Petreanu, M. 2017. Estudo fitoquímico e avaliação da ação biológica de três espécies da flora catarinense: *Solanum capsicoides*, *Rubus rosifolius* e *Myriophyllum frondosum*. Tese de Doutorado. Programa de pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí.
- Petreanu, M., E.K. Ferreira, A.P.M. Sagaz, D.B. Vendramini-Costa, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, A. Campos, V. Cechinel-Filho, F.D. Monache, and R. Niero. 2015. Uncommon trimethoxylated flavonol obtained from *Rubus rosifolius* leaves and its antiproliferative activity. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015: 341216 doi:10.1155/2015/341216.
- PIER, 2014. Pacific Islands Ecosystems at Risk. Honolulu, USA: HEAR, University of Hawaii. <http://www.hear.org/pier/index.html>
- Pittarello, J.R.J., M. Petreanu, V. Cechinel-Filho, C.A. Rodrigues, L.C. Klein-Junior, and R. Niero. 2019. Extraction optimization of 5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavonol, a bioactive flavonoid from *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves. *Nat. Prod. Commun.* 14: 47-50.
- PROTA, 2014. PROTA4U web database. Grubben GJH, Denton OA, eds. Wageningen, Netherlands: Plant Resources of Tropical Africa. <http://www.prota4u.org/search.asp>
- Rakotoarivelo, N.H., F. Rakotoarivony, A.V. Ramarosandratana, V.H. Jeannoda, A.R. Kuhlman, A. Randrianasolo, and R.W. Bussmann. 2015. Medicinal plants used to treat the



- most frequent diseases encountered in Ambalabe rural community, Eastern Madagascar. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 11: 68. doi: 10.1186/s13002-015-0050-2
- Riedl, S.J., and Y. Shi. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 897-907.
- Salvesen, G.S. 2002. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem.* 38: 9-19.
- Souza, P., T. Boeing, L.B. Somensi, C.C. Cechinel-Zanchett, J.K. Bastos, M. Petreanu, R. Niero, V. Cechinel-Filho, L.M. Silva, and S.F. Andrade. 2017. Diuretic affect of extracts, fraction and two compounds $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid and 5-hydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone from *Rubus rosifolius* Sm. (Rosaceae) leaves in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 390:351-360.
- Souza, A.C.S., L.K. Silva, T.B. Queiroz, E.S. Marques, C.A. Hiruma-Lima, I.O.M. Gaivão, and E.L. Maistro. 2020. Citral presents cytotoxic and genotoxic effects in human cultured cells. *Drug Chem. Toxicol.* 43: 435-440.
- Symons, P., and S. Symons. 1994. Bush heritage: An introduction to the history of plant and animal use by aboriginal people and colonists in the Brisbane and Sunshine Coast areas. Queensland, Australia. Pat and Sim Symons, Nambour, Qld. 106 pp.
- Tariq, S., S. Wani, W. Rasool, K. Shafi, M.A. Bhat, A. Prabhakar, A.H. Shalla, and M.A. Rather. 2019. A Comprehensive Review of the Antibacterial, Antifungal and Antiviral Potential of Essential Oils and Their Chemical Constituents Against Drug-Resistant Microbial Pathogens. *Microb Pathog* 134: 103580
- Tice, R.R., E. Agurel, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, and Y.F. Sasaki. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.
- Tolentino, F., P.A. Araujo, E.S. Marques, M. Petreanu, S.F. Andrade, R. Niero, F.F. Perazzo, P.C.P. Rosa, and E.L. Maistro. 2015. In vivo evaluation of the genetic toxicity of *Rubus niveus* Thunb. (Rosaceae) extract and initial screening of its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. *J. Ethnopharmacol.* 164: 89-95.
- Tuttis, K., D.L.M.G. Costa, H.L. Nunes, A.F.L. Specian, J.M. Serpeloni, L.C. Santos, E.A. Varanda, W. Vilegas, W.Martínez-Lopez, and I.M.S. Cólus. 2018. *Pouteria Ramiflora* (Mart.)



Radlk. Extract: Flavonoids Quantification and Chemopreventive Effect on HepG2 Cells. J. Toxicol. Environ. Health A 81: 792-804..

USDA-ARS, 2014. Germplasm Resources Information Network (GRIN). Online Database. Beltsville, Maryland, USA: National Germplasm Resources Laboratory. <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomysearch.aspx>

U.S. Food and Drug Administration, 2012. Guidance for Industry: S2(R1) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use.

Xu, C., C.Y. Li, and A.N. Kong. 2005. Induction of phase I, II and III drug 783 metabolism/transport by xenobiotics. Arch. Pharm. Res. 28: 249-268.

Yesil-Celiktas, O., C. Sevimli, E. Bedir, and F.Vadar-Sukan. 2010. Inhibitory Effects of Rosemary Extracts, Carnosic Acid and Rosmarinic Acid on the Growth of Various Human Cancer Cell Lines.Plant Foods Human Nutr. 65: 158-163.

Yonekubo, B.T., H.M.C. Alves, E.S. Marques, F.F. Perazzo, P.C.P. Rosa, I.O.M. Gaivão, and E.L. Maistro. 2018. The Genotoxic Effects of Fruit Extract of *Crataegus Oxyacantha* (Hawthorn) in Mice. J. Toxicol. Environ. Health A 81: 974-982.

Zanger, U.M., and M. Schwab. 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol. Ther. 138:103-141.

Figures

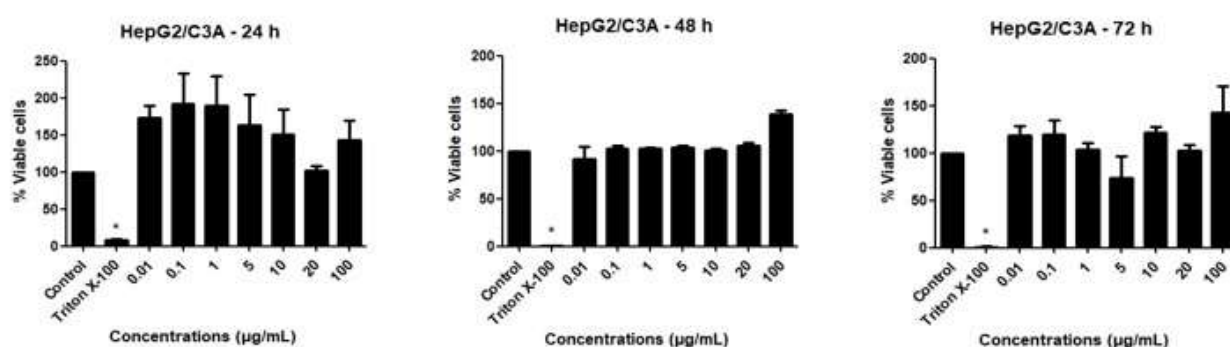


Fig. 1 – Percentage of viable HepG2/C3A cells after 24, 48 and 72 h exposure to different concentrations of *R. rosifolius* leaf extract (µg/mL), evaluated by the MTT test (experiments performed in triplicate). *Significantly different from the negative control ($p < 0.05$).

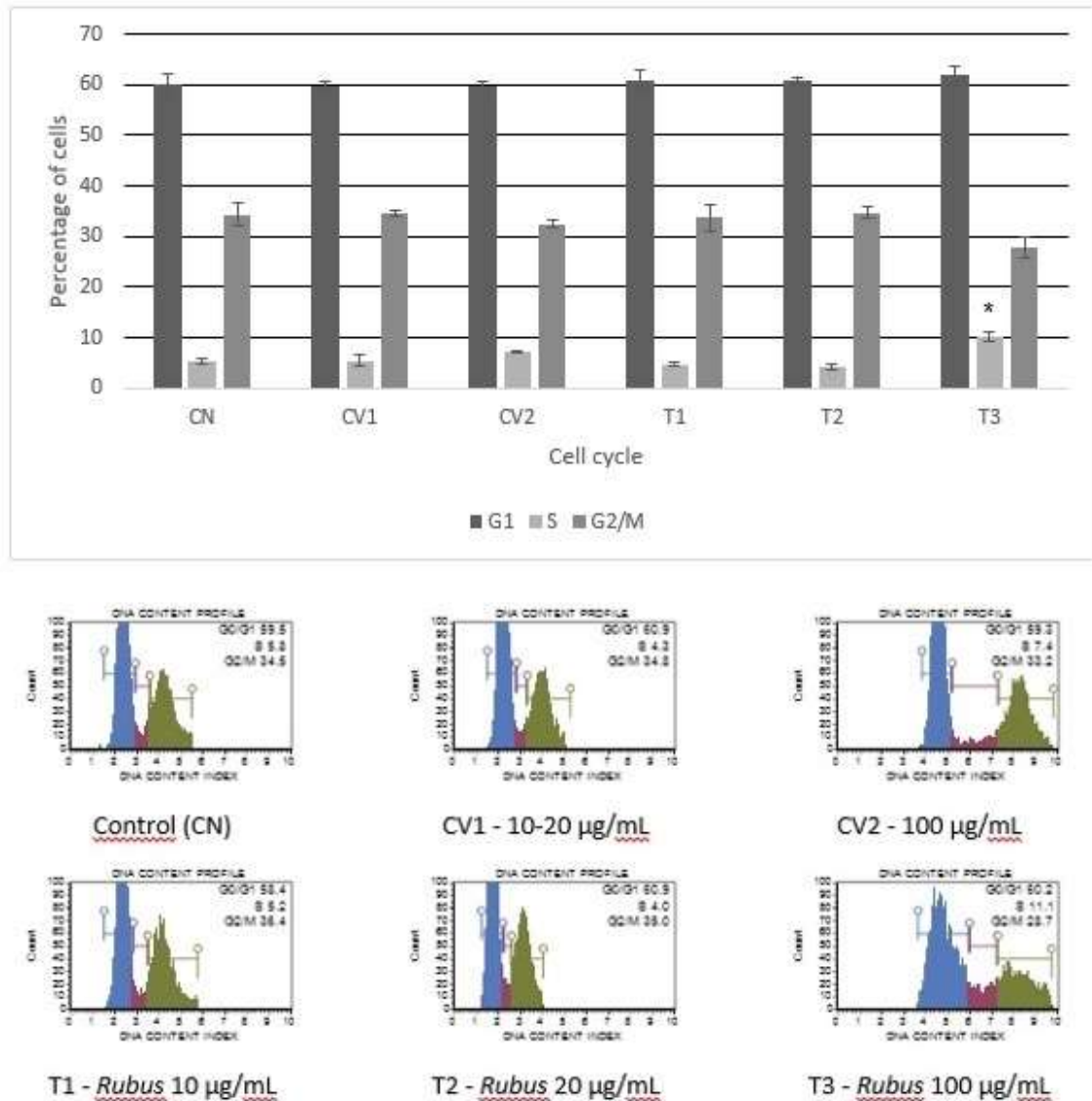


Fig. 2 – Effect of *R. rosifolius* leaf extract on cell cycle of HepG2/C3A cells by flow cytometry. Cells were treated for 24 h with 10, 20 and 100 µg/mL of the extract. Data are expressed as the mean and standard deviation of the percentage of cells at the cell cycle phases G1, S, and G2/M in three independent experiments. * Significantly different from the respective control vehicle (CV) ($p < 0.05$).

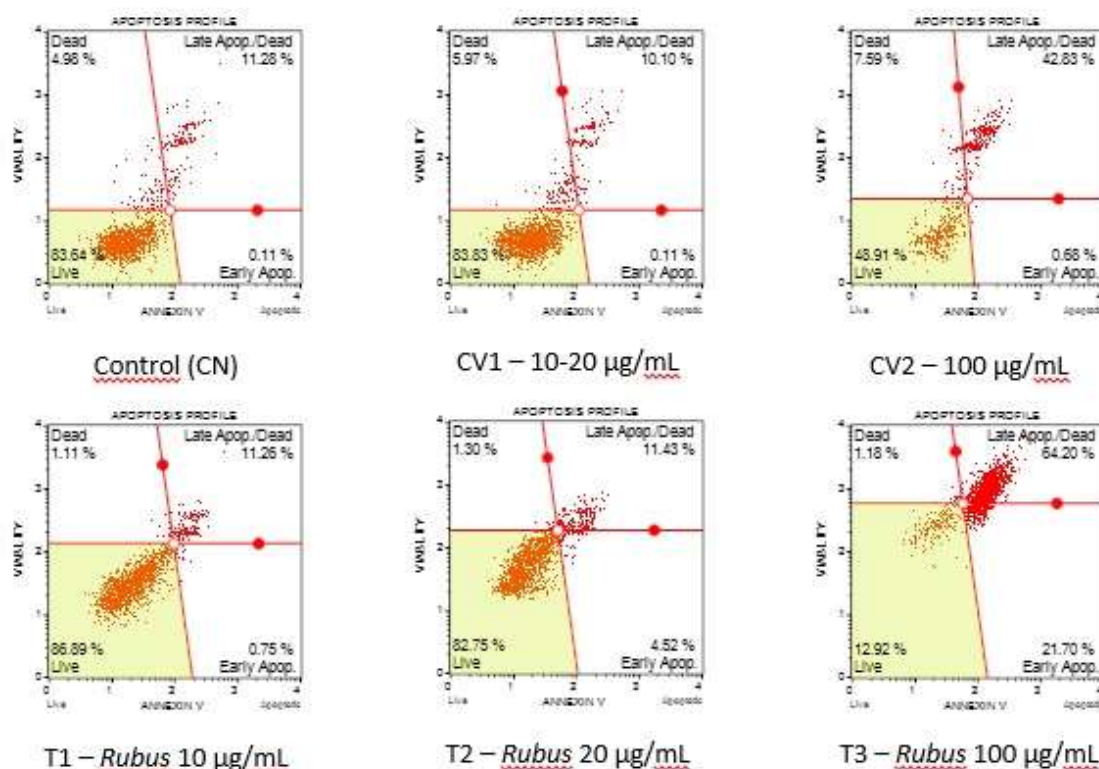


Fig. 3 – Effect of *R. rosifolius* leaf extract on apoptosis (% mean \pm SD) in HepG2/C3A cells. Cells were treated with 10, 20 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of the extract for 24 h (three independent experiments). Viable, early apoptosis, late apoptosis, and necrotic cells were measured after annexin-V and 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) staining, and analysed by flow cytometry. * $p \leq 0.05$ by ANOVA test, followed by the Dunnett's test in comparison with the respective vehicle control.

Tables

Table 1 - Optimized gradient for UHPLC-MS analysis. Mobile phase A- purified water (Milli-Q) with 0.1% formic acid and as mobile phase B-acetonitrile.

Time (min)	% Mobile phase A	% Mobile phase B
Initial	80	20
7.0	0	100
9.0	0	100
9.1	80	20
10.0	80	20



Table 2 - DNA migration (mean \pm SD) in the Comet Assay for assessing genotoxicity of *R. rosifolius* leaf extract (4 h exposure) in HepG2/C3A cells.

Treatments	Total ¹	Comet class				Scores
		0	1	2	3	
Control	3.33 \pm 1.52	146.7 \pm 1.52	3.33 \pm 1.52	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	3.33 \pm 1.52
<i>R. rosifolius</i> [0.01 μ g/mL]	8.66 \pm 1.52	141.3 \pm 1.52	7.33 \pm 2.51	1.33 \pm 2.30	0.00 \pm 0.00	10.00 \pm 3.00
<i>R. rosifolius</i> [0.1 μ g/mL]	6.33 \pm 1.52	143.7 \pm 1.52	6.33 \pm 1.52	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	6.33 \pm 1.52
<i>R. rosifolius</i> [1 μ g/mL]	25.67 \pm 1.52*	124.3 \pm 1.52*	21.67 \pm 4.93*	1.66 \pm 0.57	0.33 \pm 0.57	27.33 \pm 4.50*
<i>R. rosifolius</i> [10 μ g/mL]	20.00 \pm 3.60*	130.0 \pm 3.60*	19.67 \pm 4.04*	0.33 \pm 0.57	0.00 \pm 0.00	20.33 \pm 3.21*
<i>R. rosifolius</i> [20 μ g/mL]	18.33 \pm 5.03*	130.3 \pm 5.70*	17.67 \pm 5.13*	1.66 \pm 2.08	0.33 \pm 0.57	22.00 \pm 6.24*
<i>R. rosifolius</i> [100 μ g/mL]	23.33 \pm 2.08*	126.7 \pm 2.08*	21.00 \pm 1.00*	1.66 \pm 0.57	0.66 \pm 0.57	26.33 \pm 3.78*
Doxorubicin [2 μ M]	42.00 \pm 1.00*	108.0 \pm 1.00*	39.33 \pm 0.57*	2.00 \pm 1.00	0.66 \pm 0.57	45.33 \pm 2.51*

SD = Standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA), and Dunnett's test: statistically different from the negative control: * ($p < 0.05$), ¹ Total number of damaged cells (class 1 + 2 + 3).

Table 3 – Micronucleus (MN) frequency, nucleoplasmic bridge (NPB), nuclear buds (NB) and nuclear division index (NDI) in HepG2/C3A cells exposed to *R. rosifolius* leaf extract (in triplicate for each treatment).

Test compound	Exposition (24 h) Concentrations (μ g/mL)	Binucleated cells with MN (3000 cells)		NPB No.	NB No.	NDI (1500 cells) (Mean \pm SD)
		No.	%			
		Control	0			
Benzo(a)pyrene (Pos. Control)	2*	72 ^a	2.40 ^a	49 ^c	53 ^a	1.48 \pm 0.02 ^a
<i>R. rosifolius</i>	0.01	22	0.73	19	13	1.53 \pm 0.03 ^a
	0.1	26	0.86	19	13	1.46 \pm 0.01 ^b
	1	25	0.83	20	14	1.48 \pm 0.005 ^a
	10	34	1.13	12	14	1.34 \pm 0.02
	20	24	0.80	15	18	1.41 \pm 0.02
	100	29	0.96	14	12	1.32 \pm 0.03

*Concentration = μ M. SD = Standard deviation. Negative control: Tween 80 1%. One-way analysis of variance (ANOVA), and Dunnett's test: ^a Statistically different from the negative control: ^a ($p < 0.001$), ^b ($p < 0.01$), ^c ($p < 0.05$).



Table 4 - Relative expression of genes used in RT-qPCR reactions, their respective primer sequences and gene functions.

Primers	Direction/Sequence	Expression factor	Function
<i>CASP3</i>	F – 5' AACTGGACAGTAACATGGAG 3' R – 5' TTGCTGGCAAAGTAGAAAAG 3'	1,39	Apoptosis
<i>CASP7</i>	F – 5' TCA CCA TGC GAT CCA TCA AGA CCA 3' R – 5' TTT GTC TGT TCC GTT TCG AAC GCC 3'	2,86*	Apoptosis
<i>BBC3</i>	F – 5' GTA AGA TAC TGT ATA TGC GCT G 3' R – 5' TTT TCC ACT GTT CCA ATC TG 3'	1,93	Apoptosis
<i>BCL2</i>	F – 5' GAT TGT GGC CTT CTT TGA G 3' R – 5' GTT CCA CAA AGG CAT CC 3'	1,50	Apoptosis
<i>BECN1</i>	F – 5' CAGTATCAGAGAGAATACAGTG 3' R – 5' TGGAAAGTTGCATTAAGAC 3'	1,72	Autophagy
<i>TP53</i>	F – 5' TAC CAC CAT CCA CTA CAA CT 3' R – 5' GAC AGG CAC AAA CAC GCA C 3'	1,64	Cell cycle
<i>TRAF2</i>	F – 5' GCC CCA AGT TCC CCT TAA CT 3' R – 5' GAA TCT GCA AGG GAC TCG AC 3'	1,79	Cell cycle
<i>CDKN1A</i>	F – 5' CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC 3' R – 5' CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG 3'	1,43	Cell cycle
<i>mTOR</i>	F – 5' GGAGGAGAAATTTGATCAGG 3' R – 5' GGGCAACAAATTAAGGATTG 3'	1,24	Cell cycle
<i>MYC</i>	F – 5' TGA GGA GGA ACA AGA AGA TG 3' R – 5' ATC CAG ACT CTG ACC TTT TG 3'	1,94	Cell cycle
<i>NFKB</i>	F – 5' GCA GCT CTT CTC AAA GCA GCA 3' R – 5' GCT CAA AGT TCT CCA CCA GGG 3'	1,52	Cell cycle
<i>CYP3A4</i>	F – 5' AGT CTT TCC ATT CCT CAT CC 3' R – 5' TGC TTT TGT GTA TCT TCG AG 3'	2,15*	Xenobiotic metabolism
<i>CYP1A2</i>	F – 5' CAC TAT CAG GAC TTT GAC AAG 3' R – 5' AGG TTG ACA ATC TTC TCC TG 3'	0,50*	Xenobiotic metabolism
<i>CYP2C19</i>	F – 5' CAT GGA TAT GAA GTG GTG AAG 3' R – 5' TCC ATT GCT GAA AAC GAT TC 3'	0,32*	Xenobiotic metabolism
<i>CYP2D6</i>	F – 5' CCT ATG AGC TTT GTG CTG 3' R – 5' TTT GGA ACT ACC ACA TTG C 3'	1,77	Xenobiotic metabolism
<i>CYP2E1</i>	F – 5' GAC ACC ATT TTC AGA GGA TAC 3' R – 5' TTC ATT CAG GAA GTC TTC TG 3'	1,80	Xenobiotic metabolism

Significant expression factor for inhibition indicated by values equal to or below 0.5; and significant expression factor for expression increase by values equal to or above 2. (*) indicates a statistically significant difference $p \leq 0.05$.



5- ARTIGO 2

Avaliação da toxicidade celular e genética do extrato de caules de *Rubus rosifolius* em células HepG2/C3A.

RESUMO

Rubus rosaefolius, popularmente conhecida como “amora vermelha”, é uma planta medicinal comum na região Sul do Brasil, sendo utilizada como antidiarreico, analgésico, antimicrobiano, anti-hipertensivo e para tratar doenças estomacais. O objetivo deste estudo foi o de analisar o extrato de caules de *R.rosaefolius* (ECRr) quanto a possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos através de técnicas *in vitro*, como o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo, e efeitos sobre o ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo em células HepG2/C3A, além de avaliar a expressão de genes ligados a indução de danos ao DNA, ciclo celular, apoptose e metabolização de xenobióticos. Não foram observados efeitos citotóxicos, pelo ensaio MTT, para as concentrações entre 0,01 e 100 µg/ml do extrato. Entretanto, efeitos genotóxicos ocorreram nos tratamentos com o extrato a partir da concentração de 1 µg/ml. As análises por citometria de fluxo revelaram um aumento significativo de células na fase G2/M após tratamento com 10 µg/ml, diminuição de células na fase G0/G1 no tratamento com 100 µg/ml, e um aumento significativo no total de células apoptóticas nas três concentrações testadas do extrato. Na análise de expressão gênica, foi verificado um aumento significativo na expressão do gene de metabolização de xenobióticos *CYP1A2*. Apesar dos promissores efeitos farmacológicos de *R. rosifolius*, os resultados obtidos revelaram que o ECRr apresenta toxicidade genética e induz aumento de apoptose em células HepG2/C3A, indicando perigo e recomendando cautela no uso desta planta por seres humanos.



Palavras chaves: toxicidade de *Rubus rosifolius*, teste de micronúcleo, ensaio cometa, análise do ciclo celular, análise de apoptose, expressão gênica,

1-INTRODUÇÃO

A medicina fitoterápica tem sido usada desde tempos antigos em busca de respostas da natureza para tratar doenças humanas. O uso de chás, óleos e infusões serve como base para pesquisa farmacêutica através do uso de plantas isoladas ou combinadas. Estudos mostram que aproximadamente 80% da população de países em desenvolvimento são dependentes das plantas na atenção primária à saúde e, mais de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente derivam direta ou indiretamente das plantas, sendo que, de acordo com a OMS, 11% fazem parte da lista de medicamentos essenciais (Hostettmann & Marston 2002; Newman 2000, 2003; Butler 2004).

Apesar do amplo uso das plantas na medicina tradicional, e seu grande potencial como fonte de novos medicamentos, o estudo destas ainda é pouco explorado, uma vez que, das aproximadamente 500 mil espécies de plantas existentes no planeta, apenas cerca de 15% já foram estudadas fitoquimicamente e cerca de 6% farmacologicamente (Cragg, Newman 2013). Devido a ampla utilização e a possível ocorrência de efeitos nocivos advindos de produtos naturais, algumas agências de regulamentação e fiscalização, nacionais e internacionais, recomendam alguns testes para a avaliação da segurança do uso dessas plantas, dentre eles, testes de citotoxicidade e genotoxicidade (CNS RE251/97; ANVISA RE90/2004; OECD 2016).

Rubus rosifolius é uma planta da família Rosaceae, popularmente conhecida pelo nome de "Amora- vermelha", sendo um arbusto, de médio porte, podendo atingir até 5 metros (Kanegusuku 2016). O gênero *Rubus* abrange cerca de 715 espécies divididas em 12



subgêneros e pode ser encontrado em todos os continentes, exceto a Antártida. Há séculos estas plantas são cultivadas, principalmente para consumo dos seus frutos, porém outras partes também têm sido utilizadas com fins medicinais, devido as suas propriedades fitoterápicas (Patel 2004; Finn 2008; Alves 2014; Tolentino 2015).

O uso tradicional de *R. rosifolius* como planta medicinal envolve sua atividade microbiana, antibacteriana, diurética e antinociceptiva (Kunegusuku 2007; Ostrosky 2011; Petreanu 2015; Souza et al. 2017). Estudos mais recentes envolvendo a caracterização fitoquímica e efeitos farmacológicos de extratos de folhas e caules dessa planta revelaram efeitos diuréticos, antidepressivos, antiproliferativos e gastroprotetor comparados com os medicamentos mais utilizados para cada caso, com destaque para o efeito gastroprotetor do extrato de caules quando comparado ao uso de Omeprazol (Petreanu 2017; Souza et al. 2017).

Alguns estudos prévios envolvendo a biossegurança do uso de plantas do gênero *Rubus* têm revelado preocupantes efeitos citotóxicos e genotóxicos. Nas espécies *R. imperialis* (Alves et al. 2014) e *R. niveus* (Tolentino et al. 2015), os autores reportaram efeitos clastogênicos/aneugênicos dos extratos de partes aéreas dessas plantas em ensaios *in vivo* com camundongos. Mais recentemente, Quadros et al. (2020) reportaram efeitos genotóxicos, interferência no ciclo celular, aumento de células em apoptose e alteração na expressão de genes relacionados a apoptose em células de hepatoma humano HepG2/C3A expostas a diferentes concentrações do extrato de folhas de *R. rosifolius*.

Neste contexto, considerando a potencial importância farmacológica de extratos e substâncias químicas isoladas de espécies de plantas do gênero *Rubus*, bem como resultados de estudos mostrando efeitos citotóxicos e genotóxicos em algumas dessas espécies, o presente estudo foi desenvolvido objetivando avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade, efeitos sobre o ciclo celular, indução de apoptose, e possíveis alterações na expressão de genes



relacionados a metabolização de xenobióticos, danos no DNA e apoptose em células hepáticas humanas HepG2/C3A, expostas ao extrato de caules de *R. rosifolius* (ECRr). Este estudo em células do fígado tem especial importância, considerando que este órgão é responsável pela metabolização de xenobióticos que chegam pelo sangue, absorvidos do trato digestivo, sendo um dos primeiros órgãos a sofrer impactos de substâncias tóxicas (Marques et al. 2019).

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Obtenção da amostra

Os caules de *R. rosifolius* foram coletados no município de Itajaí-SC (26° 54' 28" S; 48° 39' 43" W), sendo a planta identificada pelo Dr. Ademir Reis (Departamento de Botânica, UFSC), com exsicata depositada no herbário Barbosa Rodrigues (Itajaí – SC) sob a identificação V.C. filho 035. Após secagem em sala, com umidade e temperatura controlada, os materiais vegetais foram triturados e submetidos a maceração estática com metanol (MeOH) por 7 dias em recipiente fechado a temperatura ambiente. Finalizando o período de extração, os materiais foram filtrados e as soluções extrativas foram concentradas em rotaevaporador com pressão reduzida para a eliminação do solvente, sendo posteriormente secos em estufa com ar circulante a 40°C.

Após seco, o extrato metanólico bruto (EMB) foi mantido em dessecador com sílica ativada até a utilização do mesmo nos experimentos.

2.2 Caracterização do extrato

A caracterização do extrato em questão foi realizada por cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massa.



Foi utilizado como material uma solução preparada a partir de 0,2 g de caule dissolvido em metanol e água na proporção 50:50 v/v posteriormente filtrada em membrana PVDF de 0,22 μm , foram utilizados 10 μL para a cromatografia.

Foi utilizado cromatógrafo UPLC Acquity Waters juntamente com uma coluna C18 BEH Acquity Waters (1,7 μm x 2,1 mm x 50 mm) à uma temperatura de 40°C, a eluição foi realizada por modo gradiente, com vazão de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$, sendo a fase móvel A composta por água purificada (Milli-Q) com 0,1% de ácido fórmico e B composta por acetonitrila (HPLC, Merck). As condições iniciais eram de 20% B, subindo para 100% em 7 minutos, mantida assim até os 9 minutos, retornando às condições iniciais e estabilizando em 10 minutos. A detecção foi realizada por ionização Eletspray no modo íon negativo em um espectrômetro de massa triplo-quadrupolo (Waters- TQD- Acquity) com as seguintes condições: capilar de - 4 kV, cone de - 30 V, extrator de 2 V, temperatura da fonte de 150 ° C e temperatura de dessolvatação de 300 ° C. Os espectros CID MS / MS de picos de interesse foram obtidos com energia de colisão de 20 V.

2.3- Cultivo das células HepG2/C3A

As células Hep G2/C3A, células metabolizadoras do fígado da linhagem de hepatocarcinoma humano, foram obtidas junto ao banco de células do Rio de Janeiro, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As células foram mantidas em meio DMEM, com suplementação com antibiótico/antimicótico e soro fetal bovino. As culturas foram mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa e total assepsia.

2.4- Determinação da citotoxicidade



As concentrações do extrato utilizadas nos experimentos foram determinadas através do teste de viabilidade celular do MTT, realizado com as células Hep G2/C3A.

Em uma concentração de 1×10^5 , as células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços contendo 250 μL de meio DMEM completo, por 24, 48 e 72h. Passado o tempo de aderência, o meio foi descartado e as células foram submetidas aos tratamentos com as concentrações de 0,1, 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ (100 $\mu\text{g/ml}$ foi a concentração máxima possível de ser solubilizada no veículo (Tween 80 a 1%)). e foi adicionado novo meio de cultura suplementado, até completar o volume máximo de 250 μL em cada poço. Uma triplicata de poços contendo apenas meio de cultura também foi preparada para ser utilizada como o "branco" do teste.

Após o preparo das amostras contendo meio de cultura, células e extrato ou controle, aguardou-se 24, 48 e 72h para remoção dos tratamentos e foi adicionado 150 μL de MTT em cada poço. Para a ação do MTT (invitrogen™) nas células contidas nos poços, aguardou-se 4 h para a leitura. O MTT foi diluído em PBS (5mg/mL). Decorridas as 4 horas, o MTT foi retirado dos poços, e foram adicionados 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) para a solubilização dos cristais de formazan, agitando a placa durante 5 minutos. Em seguida, deu-se prosseguimento à leitura em espectrofotômetro de microplacas (Epoch-BioTek), em comprimento de onda de 550 nm. Os experimentos foram feitos em triplicata.

2.5- Teste do micronúcleo *in vitro* com bloqueio de citocinese

A metodologia do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese utilizada foi a descrita por Fenech (2000). Bezo(A)pireno (2 μM) foi utilizado como controle positivo e Tween 80 a 1% como controle negativo.



2.6- Ensaio Cometa

O protocolo usado para realização do ensaio cometa foi descrito por Tice *et al.* (2000). Anteriormente a realização do teste, foram preparadas lâminas cobertas com agarose de ponto de fusão normal (NMPA). Em uma placa de 24 poços contendo meio de cultura foram adicionados 2×10^5 de células e encaminhadas para a incubadora de CO₂ por 24 horas, até que as células aderissem no fundo do frasco de cultura. A partir dos resultados obtidos no teste MTT, foram selecionadas 6 concentrações do extrato para este ensaio (entre 0,01 e 100 µg/mL). Para o controle positivo foi usada a doxorrubicina (2 µM), e para o controle negativo foi usado o veículo diluente do extrato (Tween 80 a 1%). No momento da análise, foram adicionados à lâmina 100 uL de solução de brometo de etídio 200 µg/mL a 1%, e ela foi coberta com lamínula. O brometo de etídio é um agente intercalante, capaz de se associar ao DNA. Para visualização dos danos no DNA, as lâminas foram observadas imediatamente após coloração, em aumento de 400x, usando microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm, em sala escura. Foram analisadas 150 células de cada tratamento/repetição, para cada tipo celular, de acordo com a intensidade da cauda, classificando-as em: 0 - sem dano; 1 - dano pequeno, cauda menor que o diâmetro da cabeça; 2 - dano médio, cauda 1 ou 2 vezes maior que o diâmetro da cabeça; e 3 - dano máximo, cauda maior que 2 vezes o diâmetro da cabeça. Foi determinado o escore, isto é, o somatório da multiplicação do número de células identificadas em cada classe pelo valor da classe, sendo que esse resultado varia de 0 a 450. Não foram consideradas células apoptóticas e necróticas (Azqueta *et al.*, 2013; Araldi *et al.*, 2015).

2.7- Expressão Gênica e RT-PCR em tempo real



Foram utilizadas placas de cultura de 6 poços contendo 2×10^5 células/poço com 3000 μL de meio de cultura para HepG2/C3A. Após 24 horas de estabilização celular foram adicionados ao meio de cultura os respectivos tratamentos por 12 horas. Após esse período, o RNA total foi extraído com o TRIzol LS® (Invitrogen, Life Technologies) e RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 74106). As células foram lisadas com 750 μL de reagente TRIzol LS® diretamente nos poços e transferidas para microtubos. Foram adicionados 200 μL de clorofórmio e a solução foi agitada vigorosamente. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, os microtubos foram centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos a 4 °C. A fase translúcida foi transferida para um novo microtubo e foi adicionado igual volume de etanol 70%. O conteúdo foi homogeneizado e transferido para a coluna acoplada com um tubo coletor (fornecida pelo kit). A coluna foi centrifugada a 12000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados à coluna 700 μL do tampão RW1 (fornecido pelo kit) e, após centrifugação a 1000 rpm por 15 segundos, o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 500 μL do tampão RPE (fornecido pelo kit) e, após centrifugação a 1000 rpm por 15 segundos, o sobrenadante foi descartado. Novamente, 500 μL de tampão RPE foram adicionados e, após centrifugação a 10000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor e foi novamente centrifugada. A coluna foi colocada em um novo microtubo e foram adicionados 30 μL de água livre de RNase (fornecida pelo kit). A coluna foi centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. O RNA extraído ficou retido no sobrenadante, que é armazenado a -80 °C. A pureza das amostras foi verificada pelo aparelho NanoDrop (ThermoScientific) e a integridade foi verificada em gel de agarose 0,8%.

Em seguida, o cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA total utilizando 0,5 mM de dNTPs (Invitrogen, Life Technologies) e 4 pmol de Oligo-dT (Invitrogen, Life



Technologies). As amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos. Após esse período, as amostras foram colocadas no gelo e foram acrescentadas duas unidades de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Life Technologies), 10U M-MLV transcriptase reversa (Invitrogen, Life Technologies), 10% de tampão de reação 10x (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl – Invitrogen) e 1,5 mM MgCl₂ em uma reação de 20 µL de volume final. As amostras foram incubadas em termociclador a 37 °C por 50 minutos.

RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando 5 µL de cDNA na concentração 50 ng/µL e 0,375 µM de cada primer forward e reverse, que amplifica regiões parciais dos transcritos de interesse, em uma reação de 12 µL de volume final. As reações foram realizadas em termociclador Bio-Rad C1000 Touch™ ThermalCycler (CFX96™ Real-Time System). Foram avaliados transcritos de genes envolvidos na apoptose (*CASP3*, *CASP7*, *BBC3* e *BCL2*), autofagia (*BECN1*), ciclo celular (*TP53*, *TRAF2*, *CDKN1A*, *mTOR*, *MYC* e *NFKB*) e metabolismo xenobiótico (*CYP3A4*, *CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP2E1*), como pode ser observado na tabela 5. A amplificação dos fragmentos foi detectada pela fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBR® Green Supermix (5 µL) (Bio-Rad, United States). A curva de melting foi obtida pelo aumento da temperatura de 50 °C a 95 °C em intervalos de 0.5 °C a cada 5 segundos. As reações foram realizadas em três repetições biológicas. Os dados foram normalizados pelo gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e foram realizadas três repetições experimentais.

2.8- Análise estatística

Para o teste do micronúcleo, foram utilizados teste de ANOVA (one-way analysis of variance) seguido de t- de students para análise de dados. Já para o ensaio cometa, os dados foram analisados utilizando teste (ANOVA), seguidos do teste de Tukey-Kramer para



múltiplas comparações, ambos utilizando o software GraphpadPrism® 6 (Versão 6.01). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes com $P < 0,05$.

Os níveis de expressão dos genes em estudo foram determinados pelo método de Pfaffl e colaboradores (2001), com análise estatística realizada através do Software Relative Expression Software Tool (REST) 2009 v.2.0.13 (Pfaffl *et al.*, 2002). Foram consideradas diferenças significativas de expressão gênica, quando a expressão relativa foi ≤ 0.5 ou ≥ 2 .

RESULTADOS

A partir de análises fitoquímicas do extrato do caule de *Rubus rosifolius*, realizadas por LC-MS e comparação de sua fragmentação MS / MS com dados da literatura (Alves et al. 2014; Tolentino et al. 2015), foram observados quatro compostos principais: niga-ichigosideo, quercetina glucuronide, ácido tormentico e 5,7-dihydroxy- 6,8,4'-trimethoxyflavonol (Figuras apresentadas como material suplementar).

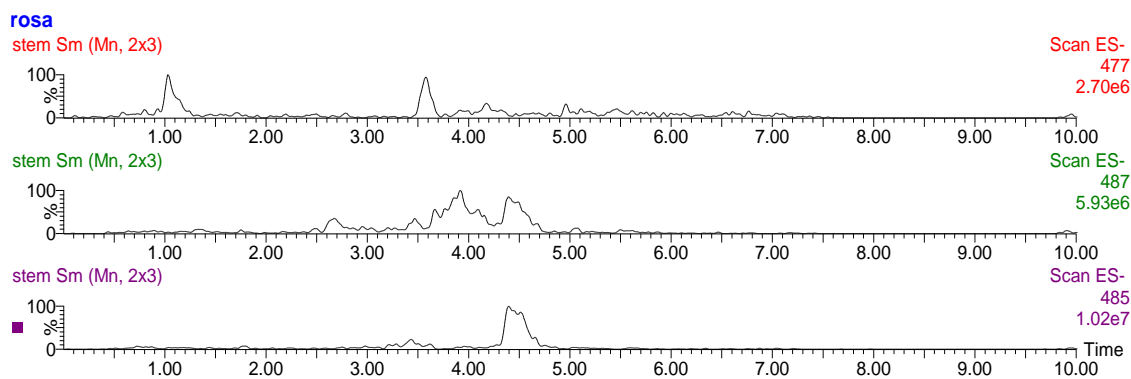


Figura 1. Cromatografia de íons indicando a presença de m/z 477, RT 1.0 min, m/z 487, RT 3.9 min e m/z 485, RT 4.4 min

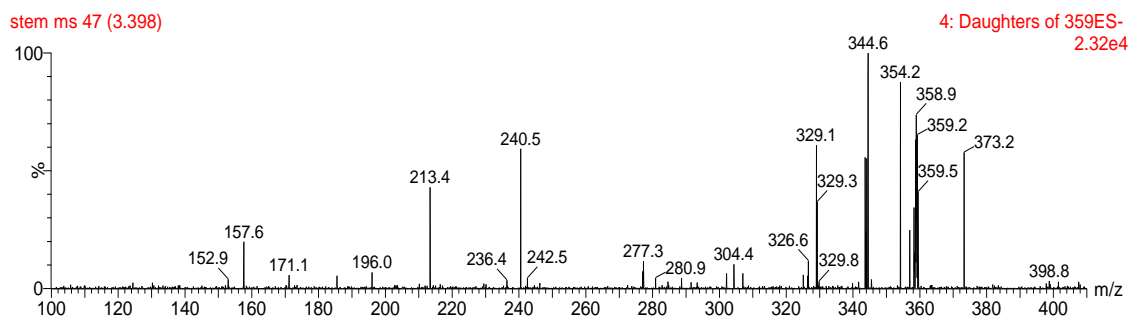


Figura 2. Espectrometria de massa MS/MS of m/z 665, m/z 487, m/z 485 and m/z 359

Viabilidade celular (teste do MTT)

Os resultados da avaliação da viabilidade celular da linhagem HepG2/C3A pelo teste do MTT são mostrados na Figura 3. As concentrações do ECRr variando entre 0,1 e 100 $\mu\text{g/mL}$ não acarretaram diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular, em comparação com o controle negativo, nos três tempos de exposição investigados. Como já era esperado, apenas o controle positivo Triton-X acarretou uma diminuição drástica na porcentagem de células viáveis (Fig. 3).

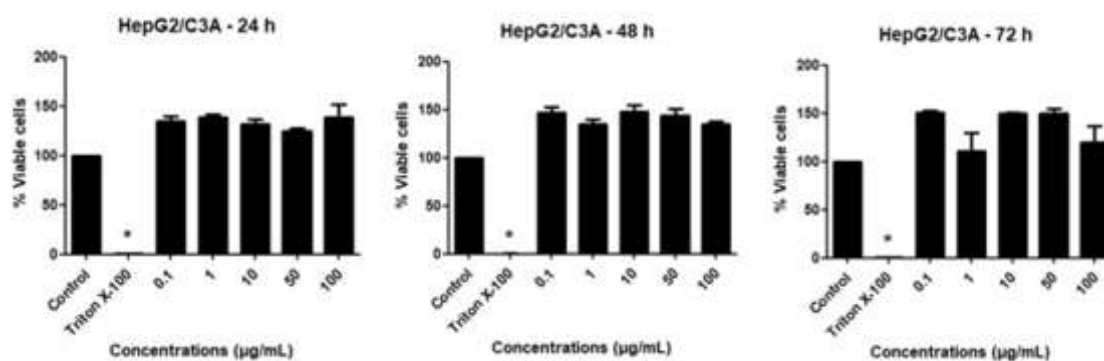


Figura 3 - Porcentagem de células HepG2/C3A viáveis após 24, 48 e 72 h de exposição a diferentes concentrações do extrato de caule de *R. rosaefolius*. Avaliação feita pelo teste do MTT. *Resultado com diferença estatística significativa em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$).



Avaliação de genotoxicidade e clastogenicidade/aneugenicidade

A Tabela 1 mostra os resultados da avaliação da genotoxicidade do ECRr pelo ensaio cometa. As concentrações de 1 µg/mL e superiores acarretaram um aumento estatisticamente significativo no número total de células com danos no DNA, bem como nos scores. Nos nucleóides em que se observaram quebras no DNA, a maioria dos danos foram de classe 1. Como era esperado, o controle positivo doxorrubicina acarretou um aumento significativo de danos ao DNA nas células de hepatoma, atestando a sensibilidade do teste do cometa na detecção de genotoxicidade.

Considerando o teste do micronúcleo, também a partir da concentração de 1 µg/mL do ECRr observou-se um aumento significativo de mutações cromossômicas nas células HepG2/C3A, através do aumento de células com micronúcleos e/ou pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares (Tabela 2). No controle positivo benzo(a)pireno também foi observado efeito clastogênico/aneugênico com diferença estatística em relação ao controle negativo, comprovando a sensibilidade do teste na detecção de aberrações cromossômicas.

Tabela 1- Migração do DNA (média ± desvio padrão) no ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato de caule de *Rubus rosaefolius* (após 4 horas de exposição) em células HepG2/C3A

Tratamentos	Total ¹	Classe dos cometas				Scores
		0	1	2	3	
Controle	3,00 ± 1,73	147,0 ± 1,73	3,00 ± 1,73	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,00 ± 1,73
<i>R. rosaefolius</i> [0.01 µg/mL]	2,66 ± 0,57	147,3 ± 0,57	2,00 ± 1,00	0,33 ± 0,57	0,33 ± 0,57	3,66 ± 2,08
<i>R. rosaefolius</i> [0.1 µg/mL]	4,66 ± 0,57	145,3 ± 0,57	4,66 ± 0,57	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,66 ± 0,57
<i>R. rosaefolius</i> [1 µg/mL]	7,66 ± 1,52*	142,7 ± 1,15*	6,66 ± 1,52	0,66 ± 1,15	0,33 ± 0,57	9,00 ± 1,73*
<i>R. rosaefolius</i> [10 µg/mL]	15,00 ± 1,73*	135,0 ± 1,73*	14,67 ± 2,08*	0,33 ± 0,57	0,00 ± 0,00	15,33 ± 1,52*
<i>R. rosaefolius</i> [20 µg/mL]	21,33 ± 1,15*	128,7 ± 1,15*	21,00 ± 1,00*	0,33 ± 0,57	0,00 ± 0,00	21,67 ± 1,52*
<i>R. rosaefolius</i> [100 µg/mL]	23,33 ± 3,05*	126,7 ± 3,05*	21,67 ± 2,51*	0,66 ± 1,15	1,00 ± 1,00	26,00 ± 5,29*
Doxorrubicina [2 µM]	39,33 ± 3,78*	110,7 ± 3,78*	36,67 ± 3,21*	2,00 ± 1,73	0,66 ± 0,57	42,67 ± 4,16*

One-way análise de variância (ANOVA), e teste de Dunnett e Tukey: * resultados estatisticamente diferentes em relação ao controle: (P<0.05), ¹ Número total de células com danos no DNA (classes 1 + 2 + 3).



Tabela 2 – Frequência de células binucleadas com micronúcleo (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) em células HepG2/C3A expostas ao extrato de caules de *R. rosaefolius* (experimentos feitos em triplicata).

Substância teste	Exposição (24 h) Concentrações (µg/mL)	Células binucleadas com MN (3000 céls.)		PN No.	BN No.	IDN (1500 céls.) (Média ± DP)
		No.	%			
		Controle Negativo	0			
Benzo(a)pireno (Controle Pos.)	2 ^a	65*	2.16*	37*	37*	2.05 ± 0.02
<i>R. rosaefolius</i>	0.01	18	0.60	17*	14	1.98 ± 0.04
	0.1	17	0.56	10	11	2.03 ± 0.01
	1	18	0.60	18*	12	1.96 ± 0.04
	10	27*	0.90*	14	20	2.05 ± 0.04
	20	23*	0.76*	8	21*	2.00 ± 0.04
	100	26*	0.86*	9	13	1.85 ± 0.18*

^a Concentração = µM. DP = Desvio padrão. Controle negativo: Tween 80 a 1%. One-way análise de variância (ANOVA), e teste de Dunnett: * Resultado estatisticamente diferente em comparação com o controle negativo (p<0,05).

Alterações no ciclo celular e apoptose (por citometria de fluxo)

O monitoramento do ciclo celular por citometria de fluxo mostrou que nas células HepG2/C3A expostas à concentração de 10 µg/mL do ECRr houve uma diminuição significativa de células na fase G2/M do ciclo celular, e uma diminuição de células na fase G0/G1 do ciclo celular, em comparação com os respectivos controles veículo (Tabela 3).

Na avaliação das células em apoptose pelo citômetro de fluxo observou-se que as três concentrações do ECRr (10, 20 e 100 µg/mL) acarretaram um aumento significativo no total de células em apoptose, em relação aos respectivos controles veículo (Tabela 4).

Tabela 3 – Efeitos do extrato de caules de *R. rosaefolius* sobre o ciclo celular de células HepG2/C3A (% média ± DP). As células foram tratadas por 24 h com as concentrações de 10, 20 and 100 µg/mL do extrato em meio completo, e a distribuição das células no ciclo celular foi feita com base no conteúdo de DNA, usando coloração com iodeto de propídio e citometria de fluxo. * P ≤ 0,05 pelo teste ANOVA, seguido do teste de Dunnet em comparação com os respectivos controles veículo.

Tratamentos	G0/G1	S	G2/M
Controle	58.57 ± 1.59	12.67 ± 1.91	28.60 ± 0.45
Controle veículo (100µg/mL)	59.83 ± 0,68	7.4 ± 0.20	32.50 ± 0.81



Controle veículo (10-20µg/mL)	59.93 ± 0.85	5.43 ± 1.10	34.63 ± 0.66
<i>R. rosaefolius</i> (10µg/mL)	61.97 ± 0.90	6.03 ± 0.94	31.83 ± 1.76*
<i>R. rosaefolius</i> (20µg/mL)	61.50 ± 0.65	5.53 ± 0.68	32.63 ± 1.01
<i>R. rosaefolius</i> (100µg/mL)	55.63 ± 0.25**	9.86 ± 0.45	34.07 ± 0.65
Controle positivo	60.97 ± 1.27	8.53 ± 1.60	30.40 ± 2.78

Tabela 4 – Efeito do extrato de caules de *R. rosaefolius* em células HepG2/C3A em relação a apoptose (% média ± desvio padrão). As células foram tratadas com as concentrações de 10, 20 and 100 µg/mL do extrato durante 24 h. Células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia, células necróticas e o total de células apoptóticas foram quantificadas após coloração com iodeto de propídeo e anexina-V, e analisadas por citometria de fluxo. * P ≤ 0.05 pelo teste ANOVA, seguido de Dunnet, em comparação com os respectivos veículos dos controles.

Tratamentos	Células viáveis	Céls. Apoptose inicial	Céls. Apoptose tardia	Céls. em Necrose	Total céls. apoptóticas
Controle	80.75 ± 0.89	0.62 ± 0.33	8.02 ± 1.10	10.75 ± 2.02	8.65 ± 1.13
Controle veículo (100µg/mL)	52.10 ± 2.89	0.69 ± 0.23	39.44 ± 3.55	7.76 ± 0.93	40.14 ± 3.41
Controle veículo (10-20µg/mL)	84.17 ± 0.43	0.10 ± 0.03	9.97 ± 0.13	5.76 ± 0.45	10.06 ± 0.15
<i>R. rosaefolius</i> (10 µg/mL)	78.74 ± 1.48**	1.94 ± 0.28***	14.00 ± 1.10	5.32 ± 0.28	15.94 ± 1.28**
<i>R. rosaefolius</i> (20 µg/mL)	73.01 ± 0.79***	2.09 ± 0.22	18.61 ± 0.67***	6.28 ± 0.61	20.71 ± 0.56***
<i>R. rosaefolius</i> (100 µg/mL)	59.63 ± 0.26***	0.69 ± 0.14	31.89 ± 0.47**	7.79 ± 0.52	32.58 ± 0.40***
Controle positivo	57.83 ± 1.19	2.76 ± 1.46	28.52 ± 1.08	10.89 ± 2.74	31.28 ± 2.31*

Análise da expressão gênica por PCR-RT

A análise da expressão gênica realizada através de PCR-RT em células HepG2/C3A mostrou que o ECRr, na concentração de 20 µg/ml, produziu um aumento significativo na expressão gênica relativa do gene de metabolização de xenobióticos *CYP1A2* (Tabela 5). Nos outros 15 genes investigados, não foi observada alteração estatisticamente significativa na expressão gênica.

Tabela 5. Expressão relativa dos genes utilizados nas reações de PCR-RT, suas respectivas sequências primers e funções. Tratamento com o extrato de caules de *R. rosaefolius*.

Primers	Direção/Sequência	Fator de Expressão	Função
CASP3	F – 5' AACTGGACAGTAACATGGAG 3' R – 5' TTGCTGGCAAAGTAGAAAAG 3'	1,07	Apoptose
CASP7	F – 5' TCA CCA TGC GAT CCA TCA AGA CCA 3' R – 5' TTT GTC TGT TCC GTT TCG AAC GCC 3'	1,49	Apoptose
TRAF2	F – 5' GCC CCA AGT TCC CCT TAA CT 3' R – 5' GAA TCT GCA AGG GAC TCG AC 3'	1,00	Controle proliferação celular
CDKN1A	F – 5' CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC 3' R – 5' CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG 3'	1,20	Regulação Ciclo celular



mTOR	F – 5' GGAGGAGAAATTTGATCAGG 3' R – 5' GGGCAACAAATTAAGGATTG 3'	1,00	Controle Proliferação celular
MYC	F – 5' TGA GGA GGA ACA AGA AGA TG 3' R – 5' ATC CAG ACT CTG ACC TTT TG 3'	1,39	Controle proliferação celular
NFKB	F – 5' GCA GCT CTT CTC AAA GCA GCA 3' R – 5' GCT CAA AGT TCT CCA CCA GGG 3'	1,15	Controle proliferação celular
BECN1	F – 5' CAGTATCAGAGAGAATACAGTG 3' R – 5' TGGAAGGTTGCATTAAGAC 3'	1,39	Autofagia
BBC3	F – 5' GTA AGA TAC TGT ATA TGC GCT G 3' R – 5' TTT TCC ACT GTT CCA ATC TG 3'	1,71	Apoptose
TP53	F – 5' TAC CAC CAT CCA CTA CAA CT 3' R – 5' GAC AGG CAC AAA CAC GCA C 3'	1,47	Regulação Ciclo celular
BCL2	F – 5' GAT TGT GGC CTT CTT TGA G 3' R – 5' GTT CCA CAA AGG CAT CC 3'	1,39	Apoptose
CYP3A4	F – 5' AGT CTT TCC ATT CCT CAT CC 3' R – 5' TGC TTT TGT GTA TCT TCG AG 3'	1,64	Metabolismo
CYP1A2	F – 5' CAC TAT CAG GAC TTT GAC AAG 3' R – 5' AGG TTG ACA ATC TTC TCC TG 3'	2,98*	Metabolismo
CYP2C19	F – 5' CAT GGA TAT GAA GTG GTG AAG 3' R – 5' TCC ATT GCT GAA AAC GAT TC 3'	0,72	Metabolismo
CYP2D6	F – 5' CCT ATG AGC TTT GTG CTG 3' R – 5' TTT GGA ACT ACC ACA TTG C 3'	1,68	Metabolismo
CYP2E1	F – 5' GAC ACC ATT TTC AGA GGA TAC 3' R – 5' TTC ATT CAG GAA GTC TTC TG 3'	1,26	Metabolismo

Fator de expressão significativo para inibição indicado por valores iguais ou abaixo de 0.5; e Fator de expressão significativo para aumento de expressão por valores iguais ou acima de 2. (*) indica diferença estatisticamente significativa $p \leq 0,05$.

DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou, por meio dos testes descritos, a possível toxicidade genética e celular do ECRr, especificamente em células humanas HepG2/C3A, uma vez que estudos anteriores já haviam destacado os efeitos terapêuticos de extrato de partes aérea da mesma planta (Bagattoli *et al.* 2016; Mauro *et al.* 2002; Petreanu 2017; Petreanu *et al.* 2015; Souza *et al.* 2017; Ranbaran *et al.* 2020) com destaque efetivo para efeito gastroprotetor do ECRr (Petreanu 2017), e observado efeitos genotóxicos do extrato de folhas de *R. rosifolius* (Quadros *et al.* 2020).

O teste do MTT utilizado para análise de viabilidade celular indicou que nenhuma das concentrações testadas do ECRr causou diminuição significativa na viabilidade das células HepG2/C3A. No entanto, os resultados mostraram um aumento no percentual de células viáveis nos grupos tratados com o extrato em comparação ao controle negativo. O princípio



do teste do MTT baseia-se em avaliar a capacidade das células em biotransformar os sais de tetrazolium em cristais de formazan (Mosmann, 1983). Como no presente trabalho o ECRr induziu um aumento significativo na expressão relativa do gene *CYP1A2*, gene da família do citocromo P450 responsável pela metabolização de xenobióticos (Guengerich 2008), esse aumento na capacidade de metabolização pode ser o responsável pela observação do aumento da viabilidade celular observada no teste do MTT.

A não observação de toxicidade celular, avaliada por parâmetros como a viabilidade celular e a capacidade de proliferação celular também foi reportada para o extrato de folhas de *R. rosifolius* e outras espécies do gênero *Rubus*. Em estudos *in vitro*, Kreander et al. (2006) reportaram ausência de citotoxicidade do extrato de *R. idaeus* em células de adenocarcinoma epitelial colorretal humano (Caco-2), e Quadros *et al.* (2020) não observaram toxicidade celular pelo teste do MTT em células HepG2/C3A expostas ao extrato de folhas de *R. rosifolius*. O mesmo foi observado em estudos *in vivo* para o extrato das espécies *R. imperialis* e *R. niveus* através da análise do índice de proliferação celular de células de camundongos que ingeriram os extratos (Alves et al. 2014; Tolentino et al. 2015).

No contexto de toxicidade genética, os dados obtidos no presente estudo são opostos aos dados observados de citotoxicidade. Tanto no ensaio cometa, que detecta danos em fita simples e fita dupla do DNA (Tice et al. 2000; Burlinson 2012), quanto no teste do micronúcleo que detecta efeitos aneugênicos (que alteram o número de cromossomos na célula) e clastogênicos (quebras nos cromossomos e outras aberrações cromossômicas) (Fenech 2000; OECD 2016; Fenech 2020) foram observados efeitos genotóxicos e clastogênico/aneugênicos nas células HepG2/C3A, após exposição ao ECRr. Nos dois ensaios, a partir da concentração de 10 µg/ml, foram observados efeitos genotóxicos estatisticamente significativos, sendo que no teste do cometa já na concentração de 1 µg/ml a



genotoxicidade foi observada. Na concentração de 100 µg/ml a toxicidade genética não foi maior que a da concentração inferior de 20 µg/ml, o que sugere que algum tipo de saturação na capacidade das células absorverem e/ou metabolizarem o ECRr tenha ocorrido, ou ainda, que a toxicidade máxima do extrato foi atingida. Tal ocorrência não é incomum e tem sido reportada em ensaios *in vivo* e *in vitro* (Maistro et al. 2013; Queiroz et al. 2017).

Quadros et al. (2020) também observaram efeitos genotóxicos do extrato de folhas de *R. rosifolius* através do teste do cometa, no entanto, os autores não observaram efeitos clastogênico/aneugênicos pelo teste do micronúcleo, testando as mesmas concentrações usadas nos experimentos com o ECRr no presente estudo. A comparação dos resultados entre o extrato de folhas e o extrato de caules indica que o ECRr apresenta uma toxicidade genética maior. Possivelmente, a diferença de genotoxicidade observada entre os dois extratos esteja relacionada a diferenças na constituição química entre os extratos. A caracterização química do ECRr realizada no presente trabalho detectou a presença de niga-ichigosídeo, quercetina glucoronídeo, ácido tormêntico e 5,7-dihidroxi- 6,8,4'-trimetoxiflavonol como compostos majoritários. Estes mesmos compostos químicos foram detectados também como majoritários no extrato de folhas (Quadros et al. 2020). Mauro et al. (2002), fazendo uma caracterização química mais geral nos extratos de folhas, caules e raiz de *R. rosifolius*, relataram no extrato de caules a presença de Heterosídeos antraquinônicos (C-heterosídeo), Heterosídeos cardioativos (Núcleo esteroidal Lactona Desoxiaçúcares), Antraquinonas livres, Saponinas, Taninos, Flavonóides, Alcalóides e açúcares redutores. Os mesmos compostos foram observados no extrato de folhas, com algumas diferenças na quantidade. Niero e Cechinel-Filho (2008) reportaram a presença de Stigmasterol, β-sitosterol, β-sitosterol glycoside, ácido tormêntico acid e ácido 28-methoxytormêntico no extrato de partes aéreas, que mistura folhas



e caules. Já Pittarello et al. (2019) reportaram a presença de um raro flavonóide no extrato de folhas de *R. rosifolius*, denominado 5,7-Dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavonol.

Apesar dos resultados de caracterização química mostrarem semelhanças nas constituições dos dois extratos, Petreanu (2017) realizou estudos farmacológicos com os dois extratos e observou que o extrato de folhas apresentou efeito antiproliferativo em células de glioma (U251), mama (MCF-7) e rim (786-0), enquanto o ECRr não apresentou esse efeito. Por outro lado, nos ensaios de atividade anti-úlceras, o ECRr apresentou efeito gastroprotetor enquanto o extrato de folhas não mostrou esse efeito. Portanto, os dados disponíveis indicam que, apesar da caracterização fitoquímica dos extratos não ter revelado grandes diferenças em seus constituintes, os diferentes efeitos farmacológicos entre os dois extratos sugerem que há diferenças na sua composição. Estudos complementares com diferentes metodologias de caracterização química poderiam responder a esta questão.

Dados da literatura mostram que outras espécies de plantas do gênero *Rubus* também apresentaram efeitos genotóxicos. Alves et al. (2014) reportaram efeito clastogênico/aneugênico do extrato de partes aéreas de *Rubus imperialis* em células da medula óssea de camundongos. A caracterização química do extrato revelou a presença de saponinas e compostos esteroidais, com o niga-ichigosideo e o ácido tormêntico sendo os compostos majoritários. Em outro estudo, Tolentino et al. (2015) observaram efeito clastogênico/aneugênico em células da medula óssea de camundongos tratados com o extrato de partes aéreas de *Rubus niveus*, na concentração alta de 2000 mg/kg. Nesse extrato os autores detectaram a presença do ácido tormêntico, niga-ichigosídeo F1, estigmasterol e quercetina glucoronideo como constituintes principais. Considerando que os compostos ácido tormêntico, niga-ichigosideo e quercetina glucoronideo são encontrados como substâncias majoritárias nos extratos de *R. rosifolius* (folhas e caules), *R. imperialis* e *R. niveus* (partes



aéreas), e todas essas espécies apresentaram algum efeito genotóxico, é possível que um ou alguns desses componentes estejam envolvidos com a toxicidade genética observada. Análises desses compostos isoladamente deverão ajudar a elucidar esta questão.

Considerando os efeitos do ECRr sobre o ciclo celular das células de hepatoma humano, os resultados obtidos através da citometria de fluxo mostraram uma pequena, mas estatisticamente significativa, diminuição do percentual de células na fase G2/M na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ e diminuição de células na fase G0/G1 na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$. Entretanto, como não se observou aumento significativo de células nas outras fases do ciclo celular, tais resultados, nas condições do experimento, não permitem concluir que houve algum efeito do extrato sobre o ciclo celular das células HepG2/C3A. Alterações na expressão gênica de determinados genes desempenham um papel importante na regulação do ciclo celular, como genes para ciclinas, quinases, proteases, fatores de transcrição, helicases, componentes do cinetócoro, enzimas de reparo do DNA, dentre outros (Fischer 2017; Engeland 2018; Nguyen et al. 2018). No presente estudo foi analisada a expressão dos genes *CDKN1A*, *mTOR*, *TRAF2*, *MYC*, *NFKB* e *p53*, envolvidos no controle do ciclo celular, e a exposição das células HepG2/C3A ao ECRr não induziu alterações na expressão gênica relativa de nenhum deles, nas condições do experimento, confirmando a não ocorrência de efeitos sobre o ciclo celular observada pela citometria de fluxo.

Por outro lado, os resultados da citometria de fluxo em relação a apoptose, revelaram que as três concentrações do ECRr induziram uma diminuição no percentual de células viáveis, e um consequente aumento significativo no total de células em apoptose. Quando o material genético de uma célula é danificado e detectado, sistemas de defesa de dano é acionado para tentar repará-lo. Se não puder ser reparado, a célula entra em processo de apoptose para garantir que não transmitirá o DNA danificado (Taylor et al. 2008; Spencer and



Sorger 2011). Nesse contexto, é provável que os efeitos genotóxicos e clastogênico/aneugênicos observados no material genético das células HepG2/C3A no presente trabalho sejam responsáveis pela indução de apoptose observada nessas células. Outros trabalhos publicados na literatura também reportaram uma correlação entre níveis elevados de danos ao material genético e/ou instabilidade genética e indução de apoptose (Gholami et al. 2014; Malaekheh-Nikouei et al. 2019; Quadros et al. 2020). Quadros et al. (2020) reportaram danos genotóxicos e observaram um aumento de células HepG2/C3A em apoptose, após exposição ao extrato de folhas de *R. rosifolius* na concentração de 100 µg/ml, bem como aumento significativo na expressão gênica relativa de *CASP7* nos ensaios com PCR em tempo real. No presente trabalho, contudo, apesar do ECRr ter induzido um aumento significativo de células em apoptose nos experimentos com a citometria de fluxo, as análises de PCR em tempo real desenvolvidas não evidenciaram alteração significativa na expressão gênica dos genes *CASP3*, *CASP7*, *BBC3* e *BCL2*. Talvez as condições do experimento como tempo de exposição à amostra e/ou concentrações utilizadas não tenham permitido a detecção de alteração na expressão dos genes investigados. Também é curioso que o ECRr tenha causado indução de apoptose, como foi detectado pela citometria de fluxo, sem que o teste do MTT tenha revelado diminuição significativa da viabilidade das células HepG2/C3A. O mesmo resultado foi reportado para o extrato de folhas de *R. rosifolius* (Quadros et al. 2020). De acordo com os autores, é possível que após exposição ao extrato, outro tipo de morte celular que não envolva incapacidade de detoxificação de enzimas do retículo endoplasmático liso e/ou inviabilização da atividade mitocondrial, esteja ocorrendo.

As células HepG2/C3A utilizadas nesse estudo são células hepáticas humanas caracterizadas pela capacidade de metabolização de xenobióticos, por apresentarem atividade induzível de enzimas de fase I e II (Walter and Willem 2007). Dentre as diversas isoformas



existentes do citocromo P450, no presente trabalho foi monitorada a expressão gênica de cinco isoformas consideradas mais importantes na metabolização de fármacos: *CYP3A4*, *CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP2E1* (Meyer 1996; Danielson 2002). Somente a isoforma *CYP1A2* apresentou um aumento significativo da expressão gênica relativa após exposição ao ECRr. Quadros et al. (2020) analisaram a expressão gênica de isoformas do citocromo P450, após exposição das células HepG2/C3A ao extrato de folhas de *R. rosifolius*, nas mesmas condições experimentais desenvolvidas no presente trabalho para o extrato de caules, e observaram que houve uma redução significativa da expressão gênica relativa das isoformas *CYP1A2* e *CYP2C19*, e um aumento na expressão da isoforma *CYP3A4*. As diferenças observadas, de aumento ou diminuição da expressão gênica das isoformas CYP, sugerem ter ocorrido devido a diferenças na constituição química entre os extratos, visto que todas as outras variantes da metodologia foram idênticas.

Considerando as condições experimentais desenvolvidas no presente estudo, pode-se concluir que o ECRr apresentou efeitos genotóxicos e clastogênico/aneugênicos em células de hepatoma humano HepG2/C3A, nas concentrações iguais e superiores a 10 µg/ml. Tal toxicidade genética levou a um aumento significativo no número total de células HepG2/C3A em apoptose. O aumento na expressão do gene *CYP1A2* nas células HepG2/C3A confirma a metabolização do extrato por essas células.

Levando em conta as promissoras propriedades farmacológicas do ECRr, bem como de alguns dos compostos majoritários já identificados e estudados no contexto farmacológico, é fundamental a ampliação das investigações envolvendo a toxicidade celular e genética desse extrato e seus principais compostos ativos para a compreensão dos potenciais perigos que pode representar para o genoma humano, tanto em ensaios *in vitro* com células sem capacidade de metabolização com enzimas hepáticas, como posteriormente em ensaios *in*



vivo. Enquanto os referidos estudos não forem desenvolvidos/concluídos, recomenda-se cautela no uso de *R. rosifolius* por seres humanos, frente à toxicidade genética inicialmente observada.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, A. B. C. R., R. S. Santos, S. S. Calil, R. Niero, J. S. Lopes, F. F. Perazzo, P. C. P. Rosa, S. F. Andrade, V. Cechinel-Filho, and E. L. Maistro. 2014. Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract in vivo and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. *J. Ethnopharmacol* 153 (3):694–700. doi: 10.1016/j.jep.2014.03.033.
- ANVISA. 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 90, de 16 de março de 2004. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Acesso em: 17 jul. 2020. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RE_N_90_anvisa.pdf>.
- Araldi, R. P., T. C. de Melo, T. B. Mendes, P. L. de Sá Júnior, B. H. Nozima, E. T. Ito, R. F. de Carvalho, E. B. de Souza, R & de Cassia Stocco. 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 72, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004>
- Azqueta, A., A. R. & Collins. 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of toxicology*, 87(6), 949–968. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
- Bagattoli, P. C., D. D. Cipriani, L. N. Mariano, M. Correa, T. M. Wagner, V. F. Noldin, V. Cechinel-Filho, R. Niero, T. S. Almeida, and M. R. Arantes. 2016. Phytochemical, antioxidant and anticancer activities of extracts of seven fruits found in the southern Brazilian flora. *Indian J. Pharm. Sci.* 78 (1):34–40. doi:10.4103/0250-474X.180239.
- Burlinson, B. 2012. The in vitro and in vivo Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.
- Butler M. S. 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, 67(12), 2141–2153. <https://doi.org/10.1021/np040106y>



- CNS. 1997. Conselho Nacional de Saúde, Resolução nº 251, 07/08/1997. Acesso em: 12 nov. 2020. < <http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso251.doc> >.
- Collins, A. R., A. A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovanelli, M. Kruszewski, C. C. Smith, and R. Stetina. 2008. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis* 23(3):143–51. doi:10.1093/mutage/gem051.
- Cragg, G. M., and D. J. Newman. 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (6):3670–95. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- Danielson, P. 2002. [The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans](#). *Current Drug Metabolism* 3: 561-597.
- Engeland K. 2018. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ.* 25:114–132.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455 (1–2):81–95. doi:10.1016/S0027-5107(00)00065-8.
- Fenech M. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes*, 11(10), 1203. <https://doi.org/10.3390/genes11101203>
- Finn, C., B. M. Yorgey, B. C. Strik, and R. Martin. 2008. New USDA-ARS blackberry cultivars bring diversity to the market. *Acta Hortic.* 777. doi:10.17660/ActaHortic.2008.777.8.
- Fischer M. 2017. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene.* 36:3943–3956.
- Gholami, L., H. R. M. Sadeghnia. R. Darroudi, and Kazemi Oskuee. 2014. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity induced by different molecular weights of polyethylenimine/DNA nanoparticles. *Turkish J. Biol.* 38:380–87. doi:10.3906/biy-1309-51.
- Guengerich, F.P. 2008. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 21: 70-83.
- Hostettmann, K., A. Marston. 2002. Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews* 1, 275–285. <https://doi.org/10.1023/A:1026046026057>
- Kanegusuku, M., D. Sbors, E. S. Bastos, M. M. D. Souza, V. Cechinel-Filho, R. A. Yunes, F. D. Monache, and R. Niero. 2007. Phytochemical and Analgesic Activity of Extract,



- Fractions and a 19-Hydroxyursane-Type Triterpenoid Obtained from *Rubus rosaefolius* (Rosaceae). *Biol. Pharm. Bull.* 30 (5):999–1002. doi:10.1248/bpb.30.999.
- Kreander, K., A. Galkin, S. Vuorela, P. Tammela, L. Laitinen, M. Heinonen, and P. Vuorela. 2006. In-vitro mutagenic potential and effect on permeability of co-administered drugs across Caco-2 cell monolayers of *Rubus idaeus* and its fortified fractions. *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (11):1545–52. doi:10.1211/jpp.58.11.0016.
- Maistro, E.L., G. Ganthous, M.S. Machado, T. Zermiani, S.F. Andrade, P.C.P. Rosa and F.F. Perazzo. 2013. Dragon's blood *Croton palanostigma* induces genotoxic effects in mice. *J. Ethnopharmacol.* 147: 406-411.
- Malaekheh-Nikouei, A.-M. B., L. Gholami, S. H. Mousavi, H. R. Sadeghnia, M. Mohajeri, M. Darroudi, and R. K. Oskuee. 2019. Evaluation and comparison of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptotic effects of poly-L-lysine/ plasmid DNA micro- and nanoparticles. *Human Exp. Toxicol.* 38. doi:10.1177/0960327119846924.
- Marques, E.S., J.G. Froder, P.R. Oliveira, F.F. Perazzo, P.C.P. Rosa, I.O.M. Gaivão, M.I.C. Mathias, and E.L. Maistro. 2019. Cytotoxic effects of *Euterpe oleraceae* fruit oil (açai) in rat liver and thyroid tissues. *Braz. J. Pharmacog.* 29: 54-61.
- Mauro, C., C. M. Z. Cardoso, P. S. Lopes, E. M. C. Marcondes, J. P. Miranda, M. Frota, A. L. Pacheco, D. A. O. Arruda, M. Frota, and A. L. Pacheco. 2002. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *R. rosifolius* Sm., Rosaceae. *Rev. Bras. Farmacog* 12:23–25. doi:10.1590/S0102-695X2002000300012.
- Meyer, U. 1996. Overview of enzymes of drug metabolis. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 24: 449-459.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth* 65 (1–2):55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Newman, D. J., G. M. Cragg, and K. M. Snader. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 17 (3):215–34. doi:10.1039/a902202c.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of natural products*, 66(7), 1022–1037. <https://doi.org/10.1021/np030096l>



- Niero, R., and V. Cechinel-Filho. 2008. Therapeutic Potential and Chemical Composition of Plants from the Genus *Rubus*: A Mini Review of the Last 10 Years. *Nat. Prod. Commun.* 3:437-444.
- Nguyen T.T., S.A. Grimm, P.R. Bushel, J. Li, Y. Li, B.D. Bennett, C.A. Lavender, J.M. Ward, D.C. Fargo, C.W. Anderson, [L. Li](#), [M. A. Resnick](#), [D. Menendez](#). 2018. Revealing a human p53 universe. *Nucleic Acids Res.* 46:8153–8167.
- OECD, T. G. 487. 2016. OECD guideline for the testing of chemicals. In vitro mammalian cell micronucleus test. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test-9789264264861-en.htm>
- Ostrosky, E. A., E. M. Marcondes, S. O. Nishikawa, P. S. Lopes, G. H. C. Varca, T. D. J. A. Pinto, T. V. O. Consiglieri, A. R. Baby, M. V. R. Velasco, and T. M. Kaneko. 2011. *Rubus rosifolius* extract as a natural preservative candidate in topical formulations. *Pharm Sci Tech* 12 (2):732–37. doi:10.1208/s12249-011-9635-9.
- Patel, A. V., J. Rojas, and C. G. Dacke. 2004. Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. *Cur. Med.Chem* 11 (11):1501–12. doi:10.2174/0929867043365143.
- Petreanu, M. 2017. Estudo fitoquímico e avaliação da ação biológica de três espécies da flora catarinense: *Solanum capsicoides*, *Rubus rosifolius* e *Myroparpus frondosus*. Tese de Doutorado. Programa de pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí.
- Petreanu, M., E. K. Ferreira, A. P. M. Sagaz, D. B. Vendramini-Costa, A. L. T. G. Ruiz, J. E. Carvalho, A. Campos, V. Cechinel-Filho, F. D. Monache, and R. Niero. 2015. Uncommon trimethoxylated flavonol obtained from *Rubus rosifolius* leaves and its antiproliferative activity. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015:341216. doi:10.1155/2015/341216.
- Pittarello, J.R.J., M. Petreanu, V. Cechinel-Filho, C.A. Rodrigues, L.C. Klein-Junior, and R. Niero. 2019. Extraction optimization of 5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimetoxyflavonol, a bioactive flavonoid from *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves. *Nat. Prod. Commun.* 14: 47-50.



- Quadros, A.P.O., L.M. Almeida, M. Petreanu, R. Niero, P.C.P. Rosa, A.C.H.F. Sawaya, M.S. Mantovani, I.O.M. Gaivão and E.L. Maistro. 2020. Risk assessment via genotoxicity, metabolism, apoptosis, and cell growth effects in a HepG2/C3A cell line upon treatment with *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves extract. *J. Toxicol. Environ. Health* 83: 495-508.
- Queiroz, T.B., G.F. Santos, S.C. Ventura, C.A. Hiruma-Lima, I.O.M. Gaivão, and E.L. Maistro. 2017. Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). *Genet. Mol. Res.* 16(3): gmr16039777
- Rambaran, TF, N. Nembhard, C.S. Bowen-Forbes, R. L. Alexander-Lindo. 2020. Hypoglycemic effect of the fruit extracts of two varieties of *Rubus rosifolius*. *J Food Biochem.*; 44:e13365. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13365>
- Souza, P., T. Boeing, L. B. Somensi, C. C. Cechinel-Zanchett, J. K. Bastos, M. Petreanu, R. Niero, V. Cechinel-Filho, L. M. Silva, and S. F. Andrade. 2017. Diuretic affect of extracts, fraction and two compounds 2 α ,3 β ,19 α -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid and 5-hydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone from *Rubus rosifolius* Sm. (Rosaceae) leaves in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 390 (4):351–60. doi:10.1007/s00210-016-1333-4.
- Spencer S. and P. Sorger. 2011. Measuring and Modeling Apoptosis in Single Cells. *Cell.* 144:926–939.
- Taylor R, S. Cullen, S. Martin. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:231–41.
- Tice, R. R., E. Agurel, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, and Y. F. Sasaki. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen* 35 (3):206–21. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J.
- Tolentino, F., P.A. Araujo, E.S. Marques, M. Petreanu, S. F. Andrade, R. Niero, F. F. Perazzo, P. C. P. Rosa, and E. L. Maistro. 2015. In vivo evaluation of the genetic toxicity of *Rubus niveus* Thunb. (Rosaceae) extract and initial screening of its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. *J. Ethnopharmacol.* 164:89–95. doi:10.1016/j.jep.2015.02.013.
- Walter M.A., G.E.J. Willem. 2007. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved. *Toxicol. in Vitro.* 21: 1581-1891.



6- ARTIGO 3

Investigação de potencial citotóxico e genotóxico dos extratos de folhas e caules de *Rubus rosifolius* em leucócitos humanos

RESUMO

Plantas com potencialidade medicinal também podem apresentar toxicidade para seres humanos. Parece ser o caso da espécie *Rubus rosifolius*, onde estudos preliminares evidenciaram efeitos genotóxicos do extrato de folhas e de caules em células de hepatoma humano HepG2/C3A. Considerando os destacados efeitos antidiarreicos, analgésico, antimicrobiano, anti-hipertensivo e para tratamento de doenças estomacais que esta planta apresenta, o presente estudo foi desenvolvido objetivando avaliar o potencial citotóxico e genotóxico dos extratos de folhas e de caules de *R. rosifolius* em células sem metabolização por enzimas hepáticas, os leucócitos humanos. As análises de viabilidade celular nas concentrações entre 0,01 e 100 µg/ml de ambos os extratos não evidenciaram efeitos citotóxicos. Por outro lado, as avaliações do potencial genotóxico pelo ensaio cometa evidenciaram danos significativos ao DNA dos leucócitos a partir da concentração de 10 µg/ml no extrato do caule, e efeito clastogênico/aneugênico nas concentrações de 10, 20 e 100 µg/ml tanto para o extrato de folhas, quanto para o de caules. Dentro das condições do experimento, os dados obtidos evidenciaram efeitos genotóxicos e mutagênicos de ambos os extratos também em leucócitos humanos, confirmando a toxicidade genética dos extratos de partes aéreas de *R. rosifolius* previamente observados em células metabolizadoras do fígado (HepG2/C3A).



Palavras chaves: genotoxicidade de *Rubus rosifolius*, Rosaceae, teste de micronúcleo, ensaio cometa, mutagenicidade de *Rubus rosaefolius*.

1-INTRODUÇÃO

Os medicamentos fitoterápicos são utilizados com frequência na medicina, principalmente na atenção primária, para o tratamento de inúmeras doenças (Falzon 2017, Colalto 2018). O uso de óleos, infusões e chás por várias populações compreende uma base importante para o desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica. Dados evidenciam que aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos mundialmente derivam direta ou indiretamente de plantas, sendo que 11% já fazem parte da lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Popovic 2016, Milošević-Djordjević 2018, Zor 2020).

Mesmo com o amplo uso e o grande potencial farmacológico das plantas, ainda são relativamente poucos os estudos focando a caracterização química e os efeitos farmacológicos potenciais das mesmas. Este dado pode ser corroborado com o fato de que, das aproximadamente 500 mil espécies de plantas existentes no planeta, apenas cerca de 15% já foram estudadas fitoquimicamente e cerca de 6% farmacologicamente (Cragg, Newman 2013, Shanaida 2020). Devido a ampla utilização, que pode ocorrer isoladamente ou através de combinações, e a possível ocorrência de reações adversas ou reatividade cruzada advindos de produtos naturais, algumas agências de regulamentação e fiscalização, nacionais e internacionais, recomendam alguns testes para a avaliação da segurança do uso dessas plantas, dentre eles, testes de citotoxicidade e genotoxicidade (CNS RE251/97; ANVISA RE90/2004; OECD 2016). Além da segurança, estes testes podem direcionar para tratamentos com maior efetividade clínica (Falzon, 2017).



O gênero *Rubus* (família Rosaceae) está subdividido em 12 subgêneros. Esse grupo de plantas tem distribuição endêmica em 6 dos 7 continentes, estando ausente somente na região Antártida. Há séculos estas plantas são cultivadas, principalmente para consumo dos seus frutos, porém outras partes também têm sido utilizadas com fins medicinais, devido às suas propriedades terapêuticas (Patel 2004; Finn 2008; Alves 2014; Tolentino 2015).

Dentre as espécies do gênero *Rubus* com potencialidade medicinal, pode-se destacar, devido a suas atividades antibacteriana, diurética e antinociceptiva, a espécie *R. rosifolius*, popularmente conhecida pelo nome de "Amora- vermelha" (Kunegusuku 2007; Ostrosky 2011; Petreanu 2015; Souza et al. 2017). *R. rosifolius* é uma planta da família Rosaceae de porte arbustivo, podendo atingir até 5 metros de altura (Kanegusuku 2016).

Estudos mais recentes envolvendo a caracterização fitoquímica e efeitos farmacológicos de extratos de folhas e caules dessa planta revelaram efeitos diuréticos, antidepressivos, antiproliferativos e gastroprotetor, comparados com os medicamentos mais utilizados para cada caso, com destaque para o efeito gastroprotetor do extrato de caules, quando comparado ao uso de Omeprazol (Petreanu 2017; Souza et al. 2017).

Análises do potencial citotóxico e genotóxico de extratos de plantas do gênero *Rubus* têm revelado efeitos tóxicos importantes. Nas espécies *R. imperialis* (Alves et al. 2014) e *R. niveus* (Tolentino et al. 2015) foram observados efeitos clastogênicos/aneugênicos de extratos das partes aéreas em testes *in vivo* com camundongos. No mesmo sentido, Quadros et al. (2020) observaram a presença de efeitos genotóxicos, interferência no ciclo celular, aumento de células em apoptose e alteração na expressão de genes relacionados a apoptose em células de HepG2/C3A expostas a diferentes concentrações do extrato de folhas de *R. rosifolius*. Considerando a exposição de células HepG2/C3A ao extrato de caules dessa última espécie,



Quadros et al. (in press) também reportaram efeitos genotóxicos, interferência no ciclo celular e aumento de células em apoptose.

Considerando a potencial importância farmacológica de extratos e substâncias químicas isoladas de espécies de plantas do gênero *Rubus*, bem como os resultados mostrando efeitos citotóxicos e genotóxicos em algumas dessas espécies, o presente estudo foi desenvolvido com a finalidade de obter maior informação sobre a toxicidade de extratos das partes aéreas de *R. rosifolius*, por meio de ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade de extratos de folhas e caules dessa planta, sobre células sem a metabolização por enzimas hepáticas (leucócitos).

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Obtenção da amostra

As amostras foram obtidas no município de Itajaí de acordo com os dados relatados por Quadros et al. (2020).

2.2 Caracterização dos extratos

A caracterização química do extrato de folhas e do extrato de caules de *R. rosifolius* foi feita previamente por nosso grupo de pesquisa, tendo sido apresentada nos trabalhos de Quadros et al. (2020) e Quadros et al. (in press), respectivamente.

2.3- Cultivo das células

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano utilizadas neste estudo foram obtidas através de coleta venosa de dois voluntários com idade entre 20 e 30 anos, não fumantes, sem comorbidades ou alterações de saúde física apresentadas no momento da coleta, sendo um homem e uma mulher. As células foram mantidas em meio RPMI, suplementadas com antibióticos e soro fetal bovino. As culturas foram mantidas em estufa



respeitando rigorosamente as seguintes características: a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa e total assepsia.

O Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Filosofia e Ciências, aprovou o desenvolvimento desta pesquisa em 26 de setembro de 2017 (CAAE: 76581517.3.0000.5406).

2.4- Determinação da citotoxicidade

Um teste usado tradicionalmente para detecção de viabilidade celular é o do azul de Tripán, que avalia a integridade da membrana celular, desta forma, no presente estudo este teste foi realizado de acordo com a descrição de Panda et al. (2012). Com isso, foram adicionadas 2×10^5 de células em uma placa de 24 poços, sendo estas tratadas com as concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 100,0 µg/mL dos extratos de folhas e caule de *Rubus rosifolius* e mantidas em uma estufa a 37 °C, 5% CO₂, e com os respectivos controles positivo e negativo. Os testes foram feitos em triplicata. Após 24 horas foi realizada a colheita e as células obtidas foram analisadas em microscópio ótico comum. Como controle negativo foi usado o próprio diluente Tween 80 a 1% e para o controle positivo foi usado o Triton X-100 diluído no meio de cultura sem soro fetal bovino. Células afetadas pelo extrato puderam ser vistas coradas em azul, tendo sido contadas 100 células por poço da placa.

2.5- Teste do micronúcleo *in vitro* com bloqueio de citocinese

Este teste foi realizado com base no protocolo descrito por Fenech em 2000, e revisado e padronizado recentemente pela OECD TG 487 (2016). O cultivo celular foi realizado em frascos de 25 cm² e as concentrações usadas respeitaram o obtido no teste de citotoxicidade como no ensaio anteriormente descrito. Para a realização do teste foi usado o sangue total (0,4 mL) e adicionados 5 mL de meio de cultura (RPMI) suplementado com 10% de soro fetal bovino além de fitohemaglutinina (PHA) na concentração de 10 µl/mL, para



estimular a mitogênese dos linfócitos, após este preparo a cultura foi mantida em estufa por 24 horas, quando foi homogeneizada e novamente armazenada. Transcorridas 20 horas (T= 44h), os leucócitos foram tratados com os extratos nas concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 10,0; 20,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$, e também com o controle positivo (MMS) e controle negativo (Tween 80 a 1%), após tratados foram incubados em estufa a 37 °C, 5% CO_2 , onde permaneceram por 4 horas. Posterior a este período (T= 48h), foram adicionados 6 $\mu\text{g/mL}$ de Citocalasina B em cada garrafa de cultura, com o objetivo de bloquear a citocinese. Rigorosamente 24 horas após a adição da Citocalasina B (T=72h) as células foram fixadas e coletadas.

A colheita foi feita por centrifugação (5 min a 850 g), e o pellet foi ressuspendido em solução hipotônica gelada de KCL (0,075 M por 5 minutos). Subsequentemente, as células foram lavadas uma vez com 5mL de solução gelada de metanol:ácido acético (3:1) (v/v). O procedimento de fixação foi realizado três vezes. Na última etapa de fixação foi adicionado Formaldeído (1%) para que o citoplasma fosse preservado. As células foram suspendidas, depositadas em lâminas e coradas em uma solução de corante Giemsa (5%) em tampão fosfato (pH 6,8) por cinco minutos. Para a análise das células nas lâminas, foi utilizado microscópio de luz (Zeiss, Primo Star) com a contagem de 1000 células binucleadas em aumento de 100x (FENECH, 2000; OECD TG 487, 2016).

MMS (150 μM) foi utilizado como controle positivo e Tween 80 a 1% como controle negativo.

O mesmo protocolo foi utilizado para os dois extratos.

2.6- Ensaio Cometa

O protocolo usado para realização do ensaio cometa foi descrito por Tice et al. (2000). Anteriormente a realização do teste, preparou-se lâminas cobertas com agarose de ponto de fusão normal (NMPA). Em uma placa de 24 poços juntamente com o meio de cultura foram



adicionados 2×10^5 de células e encubadas em estufa por 24 horas até as células se estabilizassem. As concentrações utilizadas no ensaio foram determinadas através dos testes de viabilidade celular citados anteriormente, foram utilizadas para ambos os extratos as concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 10,0; 20,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Para o controle positivo foi usado o MMS (45 μM), e para o controle negativo foi usado o veículo diluente do extrato (Tween 80 a 1%). A colheita da cultura foi realizada após 4 horas de incubação com o extrato testado. As células coletadas foram adicionadas a 120 μl de agarose com baixo ponto de fusão (LMPA), e depositada sobre a lâmina pré-gelatinizada sendo coberta por uma lamínula posteriormente. Após a confecção das lâminas, estas foram levadas a geladeira por 20 minutos até a solidificação da agarose. Após esse tempo, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram depositadas em solução de lise gelada previamente preparada. Decorrida 1 hora, as lâminas foram retiradas da lise e colocadas em aparelho de eletroforese e cobertas com tampão alcalino ($\text{pH} > 13$) (300 mM NaOH e 1 mM solução de EDTA), elas permanecem pelo período de 20 minutos em repouso para desnaturação do DNA. Após esse período a eletroforese é realizada (25 v, 300 mA, 20 minutos). Após a corrida eletroforética, as lâminas foram neutralizadas (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) por 5 minutos com repetição de 3 vezes do processo e secas em temperatura ambiente. Após este processo são fixadas em etanol 100% por 10 minutos e mantidas sob refrigeração até o momento da análise. Para a coloração foi usado o brometo de etídio e os nucleóides foram analisados visualmente (KOBAYASHI et al., 1995). As lâminas foram avaliadas em microscopia de fluorescência (Olympus BX-50) com aumento de 400x, com filtro de 515- 560 nm e outro filtro com barreira de 590 nm. Foram analisadas 150 células de cada tratamento/repetição, para cada tipo celular, de acordo com a intensidade da cauda, classificando-as em: 0 - sem danos; 1 - dano pequeno, cauda menor que o diâmetro da cabeça; 2 - dano médio, cauda 1 ou 2 vezes maior que o diâmetro da cabeça; e 3 - dano máximo, cauda maior que 2 vezes o diâmetro da cabeça. Foi determinado o escore, isto é, o somatório da multiplicação do número de células identificadas em cada classe pelo valor da classe, sendo que esse resultado varia de 0 (sem danos) a 4 (dano severo). Não foram consideradas células apoptóticas e necróticas (Azqueta *et al.*, 2013; Araldi *et al.*, 2015).

O mesmo protocolo foi utilizado para os dois extratos.

2.7- Análise estatística



Para o teste do micronúcleo, foram utilizados teste de ANOVA (one-way analysis of variance) seguido de t- de students para análise de dados. Já para o ensaio cometa, os dados foram analisados utilizando teste (ANOVA), seguidos do teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações, ambos utilizando o software GraphpadPrism® 6 (Versão 6.01). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes com $P < 0,05$.

RESULTADOS

Viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada a partir do método de azul de tripan, o qual se baseia na avaliação da integridade da membrana plasmática da célula. Foram testadas para os dois extratos concentrações variando entre 0,01 e 100 $\mu\text{g/mL}$ as quais foram submetidas as células PBMC dos doadores. Como controle positivo foi utilizado Triton X-100, o qual apresentou resultados que validaram o teste. Nenhuma das concentrações testadas para os dois extratos apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparadas aos controles negativos, indicando ausência de redução de viabilidade celular em todos os tempos e concentrações testadas.

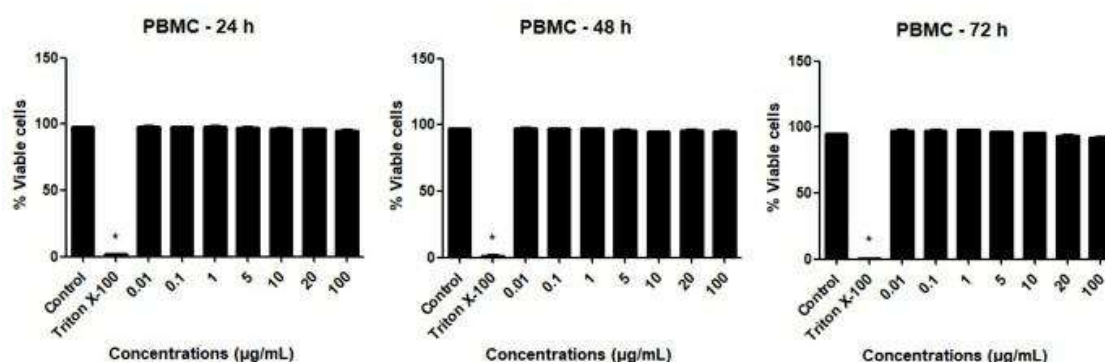


Figura 1 Porcentagem de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) após 24, 48 e 72 h de exposição as diferentes concentrações do extrato de folhas de *R. rosaefolius*. Avaliação feita pelo teste de coloração com azul de tripan. *Resultado com diferença estatística significativa em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$).

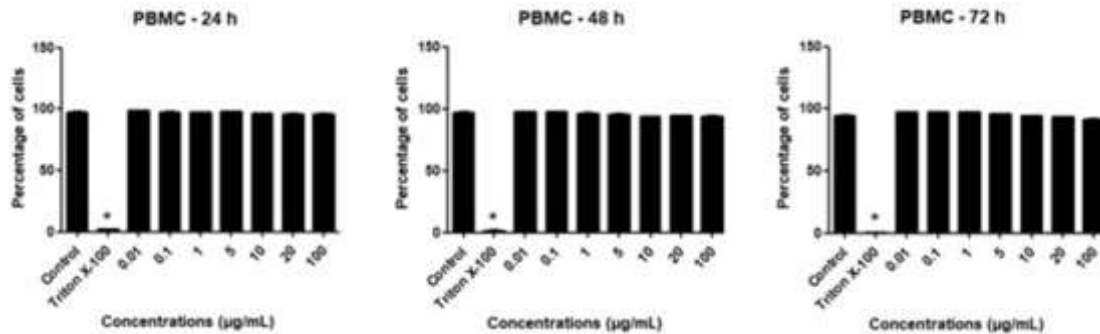


Figura 2 Porcentagem de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) após 24, 48 e 72 h de exposição as diferentes concentrações do extrato de caule de *R. rosaeifolius*. Avaliação feita pelo teste de coloração com azul de tripan. *Resultado com diferença estatística significativa em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$).

Avaliação de genotoxicidade e clastogenicidade/aneugenicidade

A Tabela 1 mostra os resultados da avaliação da genotoxicidade do extrato de folhas de *R. rosifolius* pelo ensaio cometa, enquanto a Tabela 2, mostra os resultados da avaliação do extrato de caule de *R. rosifolius*. Para o extrato de folhas, não foi observado diferença significativa em relação ao controle negativo em nenhuma das concentrações. No entanto, quanto submetidas ao extrato de caule, os resultados obtidos mostraram um aumento estatisticamente significativo no número total de células com danos no DNA, bem como nos scores, a partir da concentração de 10 µg/mL. Nos nucleóides em que se observaram danos na molécula de DNA, a maioria dos danos foram de classe 1. Como era esperado, o controle positivo MMS acarretou um aumento significativo de danos ao DNA das células atestando a sensibilidade do teste do cometa na detecção de genotoxicidade.

Quanto ao teste do micronúcleo, em ambos os extratos foi encontrado, a partir da concentração de 10 µg/mL, um aumento significativo de mutações cromossômicas nas células PBMC, através do aumento de células com micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares (Tabela 3 e Tabela 4). Nos controles positivos MMS dos dois extratos, também foi observado efeito clastogênico/aneugênico com diferença estatística em relação ao controle negativo, comprovando a sensibilidade do teste na detecção de aberrações cromossômicas.



Tabela 1 Migração do DNA (média \pm desvio padrão) no ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato de folhas de *Rubus rosaefolius* em células mononucleares do sangue periférico após 4 horas de exposição

Tratamentos	Total ¹	Classe dos cometas				Scores
		0	1	2	3	
Controle	6.80 \pm 3.19	143.2 \pm 3.19	6.80 \pm 3.19	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	6.80 \pm 3.19
<i>R. rosaefolius</i> [0.01 μ g/mL]	8.66 \pm 4.63	141.3 \pm 4.63	7.66 \pm 4.76	1.00 \pm 1.67	0.00 \pm 0.00	9.66 \pm 5.08
<i>R. rosaefolius</i> [0.1 μ g/mL]	1.83 \pm 1.83	148.2 \pm 1.83	1.83 \pm 1.83	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.83 \pm 1.83
<i>R. rosaefolius</i> [1 μ g/mL]	4.16 \pm 2.40	145.8 \pm 2.40	4.00 \pm 2.19	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	4.33 \pm 2.65
<i>R. rosaefolius</i> [10 μ g/mL]	6.16 \pm 5.41	143.8 \pm 5.41	6.00 \pm 5.21	0.00 \pm 0.00	1.16 \pm 0.40	6.50 \pm 5.89
<i>R. rosaefolius</i> [20 μ g/mL]	3.66 \pm 2.73	146.3 \pm 2.73	3.16 \pm 2.04	0.33 \pm 0.51	0.16 \pm 0.40	4.33 \pm 3.88
<i>R. rosaefolius</i> [100 μ g/mL]	8.60 \pm 2.19	141.4 \pm 2.19	8.40 \pm 2.19	0.20 \pm 0.44	0.00 \pm 0.00	8.80 \pm 2.28
MMS [45 μ M]	100.5 \pm 4.41*	49.50 \pm 4.41*	45.33 \pm 4.36*	2.83 \pm 0.75*	1.33 \pm 0.81*	55.00 \pm 4.94*

MMS = metil metano sulfonato; One-way análise de variância (ANOVA), e teste de Dunnett e Tukey: * resultados estatisticamente diferentes em relação ao controle: (P<0.05), ¹ Número total de células com danos no DNA (classes 1 + 2 + 3).

Tabela 2 Migração do DNA (média \pm desvio padrão) no ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato de caule de *Rubus rosifolius* em células mononucleares do sangue periférico após 4 horas de exposição



Tratamentos	Total ¹	Classe dos cometas				Scores
		0	1	2	3	
Controle	2,00 ± 1,26	147,8 ± 1,16	1,83 ± 1,16	0,33 ± 0,51	0,16 ± 0,40	2,16 ± 1,47
<i>R. rosaefolius</i> [0.01 µg/mL]	2,50 ± 1,37	147,5 ± 1,37	2,00 ± 1,41	0,33 ± 0,51	0,33 ± 0,51	3,16 ± 1,60
<i>R. rosaefolius</i> [0.1 µg/mL]	3,16 ± 1,47	146,8 ± 1,47	2,33 ± 1,75	0,66 ± 0,81	0,16 ± 0,40	4,16 ± 2,04
<i>R. rosaefolius</i> [1 µg/mL]	3,83 ± 1,72	146,2 ± 1,72	3,50 ± 1,87	0,33 ± 0,81	0,33 ± 0,81	4,16 ± 1,94
<i>R. rosaefolius</i> [10 µg/mL]	7,50 ± 3,01*	142,5 ± 3,01*	7,33 ± 2,73*	0,16 ± 0,40	0,00 ± 0,00	7,66 ± 3,32*
<i>R. rosaefolius</i> [20 µg/mL]	8,66 ± 4,03*	141,3 ± 4,03*	8,33 ± 3,61*	0,16 ± 0,40	0,16 ± 0,40	6,52 ± 3,89
<i>R. rosaefolius</i> [100 µg/mL]	9,66 ± 2,25*	140,3 ± 2,25*	8,83 ± 1,83*	0,33 ± 0,51	0,50 ± 0,83	11,00 ± 3,57*
MMS [45 µM]	14,33 ± 2,65*	135,7 ± 2,65*	12,00 ± 1,54*	1,83 ± 1,47	0,50 ± 0,54	17,17 ± 4,30*

Tabela 3 Frequência de células binucleadas com micronúcleo (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos de sangue periférico expostos ao extrato de folhas de *R. rosaefolius* (experimentos feitos em duplicata para as amostras de sangue de cada sexo).

Substância teste	Exposição (28 h)		Células binucleadas com MN (4000 céls.)		PN	BN	IDN (2000 céls.)
	Concentrações		No.	%			
	(µg/mL)				No.	No.	(Média ± DP)
Controle Negativo	0		17	0.42	9	7	1.72 ± 0.03
MMS (Controle Positivo)	150*		206 ^b	5.15 ^b	16 ^a	14 ^a	1.66 ± 0.03
<i>R. rosaefolius</i>	0.01		16	0.40	4	3	1.70 ± 0.04
	0.1		16	0.40	5	2	1.71 ± 0.05
	1		25	0.62	5	5	1.73 ± 0.02
	10		28 ^a	0.70 ^a	6	4	1.67 ± 0.07
	20		27 ^a	0.67	9	15 ^a	1.58 ± 0.02
	100		28 ^a	0.70 ^a	33 ^a	26 ^a	1.57 ± 0.04

Concentração = µM. DP = Desvio padrão. Controle negativo: Tween 80 a 1%. One-way análise de variância (ANOVA), e teste de Dunnett: a Resultado estatisticamente diferente em comparação com o controle negativo: a(p<0,001), b(p<0,01), c(p<0,05).

Tabela 4 Frequência de células binucleadas com micronúcleo (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos de sangue periférico expostos



ao extrato de caule de *R. rosaefolius* (experimentos feitos em duplicata para as amostras de sangue de cada sexo).

Substância teste	Exposição (28 h) Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Células binucleadas com MN (4000 céls.)		PN No.	BN No.	IDN (2000 céls.) (Média \pm DP)
		No.	%			
Controle Negativo	0	17	0.42	4	8	1.83 \pm 0.008
MMS (Controle Positivo)	150 ^a	209*	5.22*	16*	20*	1.81 \pm 0.005
<i>R. rosaefolius</i>	0.01	13	0.32	2	5	1.83 \pm 0.01
	0.1	15	0.37	2	7	1.84 \pm 0.01
	1	23	0.57	7	7	1.85 \pm 0.01
	10	27*	0.67*	7	8	1.82 \pm 0.009
	20	33*	0.82*	7	8	1.83 \pm 0.005
	100	38*	0.95*	10*	8	1.84 \pm 0.005

^a Concentração = μM . DP = Desvio padrão. Controle negativo: Tween 80 a 1%. One-way análise de variância (ANOVA), e teste de Dunnett: * Resultado estatisticamente diferente em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os medicamentos fitoterápicos são comumente usados em todos os ambientes médicos, tornando essencial sua avaliação tanto ao que se refere aos efeitos terapêutico, quanto aos possíveis efeitos citotóxicos e mutagênicos dessas plantas (Falzon 2017, Colalto 2018). Com base nos dados disponíveis sobre os diversos efeitos terapêuticos exercidos pelos extratos de partes aéreas da planta *Rubus rosifolius* (Bagattoli *et al.* 2016; Mauro *et al.* 2002; Petreanu 2017; Petreanu *et al.* 2015; Souza *et al.* 2017; Ranbaran *et al.* 2020), e também com os efeitos genotóxicos do extrato de folhas de *R. rosifolius* observados em estudos recentes realizados em células humanas HepG2/C3A (Quadros *et al.* 2020), este trabalho avaliou possíveis danos citotóxicos e genotóxicos através de técnicas *in vitro* causados por extratos de folhas e de caules de *R. rosifolius* em células sem enzimas metabolizadoras hepáticas.

A viabilidade celular, realizada a partir do método de azul de tripan, o qual se baseia na avaliação da integridade da membrana celular (Panda *et al.* 2012) apresentou ausência de diferenças estatísticas significativas, quando comparados aos controles negativos em todas as



concentrações testadas em ambos os extratos estudados. Para o teste, foram utilizadas, para os dois extratos, concentrações variando entre 0,01 e 100 µg/mL, as quais foram adicionadas á cultura celulares contendo células PBMC dos doadores. Como controle positivo foi utilizado Triton X-100, o qual apresentou resultados que validaram o teste.

Resultados semelhantes foram observados por Quadros et al. (2020) para o extrato de folhas de *R. Rosifolius* e por Alves et al. (2014) e Tolentino et al. (2015) que estudaram extratos de outras duas espécies também do gênero *Rubus*. Quadros et al. (2020) reportaram ausência de toxicidade celular pelo teste do MTT em células de hepatocarcinoma HepG2/C3A expostas ao extrato de folhas de *R. Rosifolius*, bem como resultados semelhantes em outro trabalho (QUADROS et al., in press), no qual as células HepG2/C3A foram expostas ao extrato de caule de *R. Rosifolius*. Ainda em estudos *in vitro*, Kreander et al. (2006) puderam observar ausência de efeitos citotóxicos do extrato de *R. idaeus* em células de adenocarcinoma epitelial colorretal humano (Caco-2). Resultado similar foi reportado por Alves et al. (2014) e Tolentino et al. (2015) em estudos *in vivo*, por meio da análise do índice de proliferação de células de camundongos que ingeriram os extratos das espécies *R. imperialis* e *R. Niveus*.

O teste do micronúcleo foi utilizado para detecção do potencial clastogênico/aneugênico dos extratos de folhas e caule de *R. rosifolius* FENECH 2000). Já o ensaio cometa foi utilizado para que pudesse ser avaliado o potencial genotóxico dos dois extratos (TICE et al. 2000). No ensaio cometa é possível se detectar danos ao DNA primários que podem (ou não), ser reversíveis; já no teste do micronúcleo, os danos cromossômicos detectados são irreparáveis, podendo-se afirmar que substâncias que apresentam resultados positivos podem ser qualificadas como mutagênicas (VALENTIN-SEVERIN et al. 2003; Burlinson 2012). Segundo Fenech (2008) as avaliações de danos ao DNA fornecem resposta



importantes em relação aos efeitos de substâncias, uma vez que o processo mutacional é crucial no que se diz respeito à carcinogênese.

Os resultados obtidos pelo ensaio cometa neste trabalho mostraram que, para o extrato de folhas, não foram observados efeitos genotóxicos em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, quando os leucócitos foram submetidos ao extrato do caule, observou-se um aumento estatisticamente significativo no número total de células com danos no DNA (classificados como dano 1), bem como nos scores, a partir da concentração de 10 µg/mL.

Quando observado o teste do micronúcleo, em ambos os extratos foi encontrado, a partir da concentração de 10 µg/mL, um aumento significativo de alterações cromossômicas nos leucócitos, detectada através do aumento de células com micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares. O mesmo não foi observado em células do fígado humano (HepG2/C3A) expostas ao extrato de folhas de *R. rosifolius* (Quadros et al., 2020).

A diferença entre os resultados observados nos trabalhos pode estar relacionado não somente ao tipo celular utilizado, mas também a diferenças químicas entre os extratos de caule e folhas.

A caracterização química destacou a presença de niga-ichigosídeo, quercetina glucoronídeo, ácido tormêntico e 5,7-dihidroxi- 6,8,4'-trimetoxiflavonol como compostos majoritários em ambos os extratos. Estes mesmos compostos químicos foram detectados no extrato de folhas de *R. rosifolius* por Quadros *et al.* (2020). Mauro et al. (2002), fazendo uma caracterização química mais geral nos extratos de folhas, caules e raiz de *R. rosifolius*, relataram no extrato de caules a presença de heterosídeos antraquinônicos (C-heterosídeo), heterosídeos cardioativos (Núcleo esteroidal Lactona Desoxiaçúcares), antraquinonas livres, saponinas, taninos, flavonóides, alcalóides e açúcares redutores. Os mesmos compostos foram observados no extrato de folhas, com algumas diferenças na quantidade. Niero e cechinel-



Filho (2008) reportaram a presença de stigmasterol, β -sitosterol, β -sitosterol glycoside, ácido tormêntico acid e ácido 28-methoxytormentico no extrato de partes aéreas, que mistura folhas e caules. Já Pittarello et al. (2019) reportaram a presença de um raro flavonóide no extrato de folhas de *R. rosifolius*, denominado 5,7-Dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavonol.

Mesmo com resultados semelhantes na caracterização química, os estudos farmacológicos dos dois extratos apresentaram diferenças pontuais, quanto a efeito antiproliferativo em células de glioma (U251), mama (MCF-7) e rim (786-0) e efeito gastroprotetor em ensaios de atividade anti-ulcerativas (Petreanu 2017). Portanto, os dados disponíveis indicam que, apesar da caracterização fitoquímica dos extratos não ter revelado grandes diferenças em seus constituintes, os diferentes efeitos farmacológicos entre os dois extratos sugerem que há diferenças na sua composição. Estudos complementares com diferentes metodologias de caracterização química poderiam responder a esta questão.

Em busca detalhada na literatura, foi possível encontrar estudos de outras espécies de plantas do mesmo gênero que também apresentaram efeitos genotóxicos. Em 2014, Alves *et al.* reportaram efeito clastogênico/aneugênico do extrato de partes aéreas de *Rubus imperialis* em células da medula óssea de camundongos. Já no ano de 2015, Tolentino et al. puderam observar efeito clastogênico/aneugênico em células da medula óssea de camundongos tratados com o extrato de partes aéreas de *Rubus niveus*, na concentração alta de 2000 mg/kg. Considerando os efeitos genotóxicos causados pelos extratos nas linhagens celulares em questão, assim como os compostos majoritários (ácido tormêntico, niga-ichigosideo e quercetina glucoronideo) encontrados nos extratos de *R. rosifolius* (folhas e caules), *R. imperialis* e *R. niveus* (partes aéreas), é possível que um ou alguns desses componentes estejam envolvidos com a genotoxicidade observada. Análises desses compostos isoladamente poderão ajudar a esclarecer este ponto.



Diante das condições experimentais desenvolvidas no presente estudo, pode-se concluir que o extrato de folhas de *R. rosaefolius*, assim como o extrato de caules de *R. rosifolius* apresentaram efeitos genotóxicos e efeitos clastogênico/aneugênicos nas maiores concentrações em leucócitos de sangue periférico humano, confirmando a toxicidade genética dos extratos de partes aéreas de *R. rosifolius*, previamente observados em células metabolizadoras do fígado (HepG2/C3A).

Considerando as promissoras propriedades farmacológicas dos extratos em questão, bem como de alguns dos seus compostos majoritários já identificados e estudados no contexto farmacológico, é fundamental a ampliação das investigações envolvendo a toxicidade celular e genética dos compostos majoritários presentes nos extratos das espécies do gênero *Rubus*, que apresentem efeitos farmacológicos comprovados. Paralelamente, deve-se divulgar o perigo do uso de diversos extratos brutos de plantas deste gênero, em face as diferentes publicações que reportam a ocorrência de genotoxicidade tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, especialmente em concentrações e/ou doses mais elevadas.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, A. B. C. R., R. S. Santos, S. S. Calil, R. Niero, J. S. Lopes, F. F. Perazzo, P. C. P. Rosa, S. F. Andrade, V. Cechinel-Filho, and E. L. Maistro. 2014. Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract in vivo and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. *J. Ethnopharmacol* 153 (3):694–700. doi: 10.1016/j.jep.2014.03.033.
- ANVISA. 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 90, de 16 de março de 2004. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Acesso em: 17 jul. 2020. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RE_N_90_anvisa.pdf>.
- Araldi, R. P., T. C. de Melo, T. B. Mendes, P. L. de Sá Júnior, B. H. Nozima, E. T. Ito, R. F. de Carvalho, E. B. de Souza, R. & de Cassia Stocco. 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy*



= Biomedecine & pharmacotherapie, 72, 74–82.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004>

Azqueta, A., A. R. & Collins. 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of toxicology*, 87(6), 949–968.
<https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>

Bagattoli, P. C., D. D. Cipriani, L. N. Mariano, M. Correa, T. M. Wagner, V. F. Noldin, V. Cechinel-Filho, R. Niero, T. S. Almeida, and M. R. Arantes. 2016. Phytochemical, antioxidant and anticancer activities of extracts of seven fruits found in the southern Brazilian flora. *Indian J. Pharm. Sci.* 78 (1):34–40. doi:10.4103/0250-474X.180239.

Burlinson, B. 2012. The in vitro and in vivo Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.

Butler M. S. 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, 67(12), 2141–2153. <https://doi.org/10.1021/np040106y>

CNS. 1997. Conselho Nacional de Saúde, Resolução nº 251, 07/08/1997. Acesso em: 12 nov. 2020. < <http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso251.doc> >.

Colalto C. 2018. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. *Phytotherapy research: PTR*, 32(3), 413–425. <https://doi.org/10.1002/ptr.5977>

Collins, A. R., A. A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovanelli, M. Kruszewski, C. C. Smith, and R. Stetina. 2008. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis* 23(3):143–51. doi:10.1093/mutage/gem051.

Cragg, G. M., and D. J. Newman. 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (6):3670–95. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008.

Danielson, P. 2002. [The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans](#). *Current Drug Metabolism* 3: 561-597.

Engeland K. 2018. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ.* 25:114–132.

Falzon, C. C., A. & Balabanova. 2017. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. *Primary care*, 44(2), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.02.001>

Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455 (1–2):81–95. doi:10.1016/S0027-5107(00)00065-8.



- Fenech M. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes*, 11(10), 1203. <https://doi.org/10.3390/genes11101203>
- Finn, C., B. M. Yorgey, B. C. Strik, and R. Martin. 2008. New USDA-ARS blackberry cultivars bring diversity to the market. *Acta Hort.* 777. doi:10.17660/ActaHortic.2008.777.8.
- Fischer M. 2017. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. 36:3943–3956.
- Gholami, L., H. R. M. Sadeghnia, R. Darroudi, and Kazemi Oskuee. 2014. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity induced by different molecular weights of polyethylenimine/DNA nanoparticles. *Turkish J. Biol.* 38:380–87. doi:10.3906/biy-1309-51.
- Guengerich, F.P. 2008. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 21: 70-83.
- Hostettmann, K., A. Marston. 2002. Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews* 1, 275–285. <https://doi.org/10.1023/A:1026046026057>
- Kanegusuku, M., D. Sbors, E. S. Bastos, M. M. D. Souza, V. Cechinel-Filho, R. A. Yunes, F. D. Monache, and R. Niero. 2007. Phytochemical and Analgesic Activity of Extract, Fractions and a 19-Hydroxyursane-Type Triterpenoid Obtained from *Rubus rosaefolius* (Rosaceae). *Biol. Pharm. Bull.* 30 (5):999–1002. doi:10.1248/bpb.30.999.
- Kreander, K., A. Galkin, S. Vuorela, P. Tammela, L. Laitinen, M. Heinonen, and P. Vuorela. 2006. In-vitro mutagenic potential and effect on permeability of co-administered drugs across Caco-2 cell monolayers of *Rubus idaeus* and its fortified fractions. *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (11):1545–52. doi:10.1211/jpp.58.11.0016.
- Maistro, E.L., G. Ganthous, M.S. Machado, T. Zermiani, S.F. Andrade, P.C.P. Rosa and F.F Perazzo. 2013. Dragon's blood *Croton palanostigma* induces genotoxic effects in mice. *J. Ethnopharmacol.* 147: 406-411.
- Malaekheh-Nikouei, A.-M. B., L. Gholami, S. H. Mousavi, H. R. Sadeghnia, M. Mohajeri, M. Darroudi, and R. K. Oskuee. 2019. Evaluation and comparison of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptotic effects of poly-L-lysine/ plasmid DNA micro- and nanoparticles. *Human Exp. Toxicol.* 38. doi:10.1177/0960327119846924.



- Marques, E.S., J.G. Froder, P.R. Oliveira, F.F. Perazzo, P.C.P. Rosa, I.O.M. Gaivão, M.I.C. Mathias, and E.L. Maistro. 2019. Cytotoxic effects of Euterpe oleraceae fruit oil (açai) in rat liver and thyroid tissues. *Braz. J. Pharmacog.* 29: 54-61.
- Mauro, C., C. M. Z. Cardoso, P. S. Lopes, E. M. C. Marcondes, J. P. Miranda, M. Frota, A. L. Pacheco, D. A. O. Arruda, M. Frota, and A. L. Pacheco. 2002. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *R. rosifolius* Sm., Rosaceae. *Rev. Bras. Farmacog* 12:23–25. doi:10.1590/S0102-695X2002000300012.
- Meyer, U. 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 24: 449-459.
- Milošević-Djordjević, O., Radović Jakovljević, M., Marković, A., Stanković, M., Ćirić, A., Marinković, D., & Grujičić, D. 2018. Polyphenolic contents of *Teucrium polium* L. and *Teucrium scordium* L. associated with their protective effects against MMC-induced chromosomal damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi*, 42(2), 152–162. <https://doi.org/10.3906/biy-1707-36>
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth* 65 (1–2):55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Newman, D. J., G. M. Cragg, and K. M. Snader. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 17 (3):215–34. doi:10.1039/a902202c.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of natural products*, 66(7), 1022–1037. <https://doi.org/10.1021/np030096l>
- Niero, R., and V. Cechinel-Filho. 2008. Therapeutic Potential and Chemical Composition of Plants from the Genus *Rubus*: A Mini Review of the Last 10 Years. *Nat. Prod. Commun.* 3:437-444.
- Nguyen T.T., S.A. Grimm, P.R. Bushel, J. Li, Y. Li, B.D. Bennett, C.A. Lavender, J.M. Ward, D.C. Fargo, C.W. Anderson, [L. Li](#), [M. A. Resnick](#), [D. Menendez](#). 2018. Revealing a human p53 universe. *Nucleic Acids Res.* 46:8153–8167.



- OECD, T. G. 487. 2016. OECD guideline for the testing of chemicals. In vitro mammalian cell micronucleus test. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test-9789264264861-en.htm>
- Ostrosky, E. A., E. M. Marcondes, S. O. Nishikawa, P. S. Lopes, G. H. C. Varca, T. D. J. A. Pinto, T. V. O. Consiglieri, A. R. Baby, M. V. R. Velasco, and T. M. Kaneko. 2011. Rubus rosifolius extract as a natural preservative candidate in topical formulations. Pharm Sci Tech 12 (2):732–37. doi:10.1208/s12249-011-9635-9.
- Panda A, SN Krishna, T Dada. 2012. Outcome of phacoemulsion in eyes with cataract and cornea opacity partially obscuring the pupillary area. Nepal Journal of Ophthalmology.v.4, p. 217-223,
- Patel, A. V., J. Rojas, and C. G. Dacke. 2004. Therapeutic constituents and actions of Rubus species. Cur. Med.Chem 11 (11):1501–12. doi:10.2174/0929867043365143.
- Petreanu, M. 2017. Estudo fitoquímico e avaliação da ação biológica de três espécies da flora catarinense: Solanum capsicoides, Rubus rosifolius e Myroparpus frondosus. Tese de Doutorado. Programa de pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajai.
- Petreanu, M., E. K. Ferreira, A. P. M. Sagaz, D. B. Vendramini-Costa, A. L. T. G. Ruiz, J. E. Carvalho, A. Campos, V. Cechinel-Filho, F. D. Monache, and R. Niero. 2015. Uncommon trimethoxylated flavonol obtained from Rubus rosifolius leaves and its antiproliferative activity. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015:341216. doi:10.1155/2015/341216.
- Pittarello, J.R.J., M. Petreanu, V. Cechinel-Filho, C.A. Rodrigues, L.C. Klein-Junior, and R. Niero. 2019. Extraction optimization of 5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimetoxyflavonol, a bioactive flavonoid from *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves. Nat. Prod. Commun. 14: 47-50.
- Popović, Z., Matić, R., Bojović, S., Stefanović, M., & Vidaković, V. 2016. Ethnobotany and herbal medicine in modern complementary and alternative medicine: An overview of publications in the field of I&C medicine 2001-2013. Journal of ethnopharmacology, 181, 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.034>



- Quadros, A.P.O., L.M. Almeida, M. Petreanu, R. Niero, P.C.P. Rosa, A.C.H.F. Sawaya, M.S. Mantovani, I.O.M. Gaivão and E.L. Maistro. 2020. Risk assessment via genotoxicity, metabolism, apoptosis, and cell growth effects in a HepG2/C3A cell line upon treatment with *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves extract. *J. Toxicol. Environ. Health* 83: 495-508.
- Queiroz, T.B., G.F. Santos, S.C. Ventura, C.A. Hiruma-Lima, I.O.M. Gaivão, and E.L. Maistro. 2017. Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). *Genet. Mol. Res.* 16(3): gmr16039777
- Rambaran, TF, N. Nembhard, C.S. Bowen-Forbes, R. L. Alexander-Lindo. 2020. Hypoglycemic effect of the fruit extracts of two varieties of *Rubus rosifolius*. *J Food Biochem.*; 44:e13365. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13365>
- Shanaida, M., Jasicka-Misiak, I., Makowicz, E., Stanek, N., Shanaida, V., & Wieczorek, P. P. 2020. Development of high-performance thin layer chromatography method for identification of phenolic compounds and quantification of rosmarinic acid content in some species of the Lamiaceae family. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(2), 139–145. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_322_19
- Souza, P., T. Boeing, L. B. Somensi, C. C. Cechinel-Zanchett, J. K. Bastos, M. Petreanu, R. Niero, V. Cechinel-Filho, L. M. Silva, and S. F. Andrade. 2017. Diuretic affect of extracts, fraction and two compounds $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid and 5-hydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone from *Rubus rosifolius* Sm. (Rosaceae) leaves in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 390 (4):351–60. doi:10.1007/s00210-016-1333-4.
- Spencer S. and P. Sorger. 2011. Measuring and Modeling Apoptosis in Single Cells. *Cell*. 144:926–939.
- Taylor R, S. Cullen, S. Martin. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:231–41.
- Tice, R. R., E. Agurel, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, and Y. F. Sasaki. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen* 35 (3):206–21. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J.
- Tolentino, F., P.A. Araujo, E.S. Marques, M. Petreanu, S. F. Andrade, R. Niero, F. F. Perazzo, P. C. P. Rosa, and E. L. Maistro. 2015. In vivo evaluation of the genetic toxicity



of *Rubus niveus* Thunb. (Rosaceae) extract and initial screening of its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. *J. Ethnopharmacol.* 164:89–95. doi:10.1016/j.jep.2015.02.013.

Walter M.A., G.E.J. Willem. 2007. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved. *Toxicol. in Vitro.* 21: 1581-1891.

Zor, M., & Aslan, E. L. 2020. Assessment of In Vitro Antigenotoxic Effect of *Nigella Sativa* Oil. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 17(1), 115–118. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2020.09471>



7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados indicaram que os danos genotóxicos do extrato possivelmente foram responsáveis pelas alterações no ciclo celular e pelo aumento de células em apoptose. Diante das condições experimentais do presente estudo, os dados obtidos permitem concluir que os extratos de folhas e de caules de *R. rosifolius* apresentam toxicidade celular e genética, tanto em células com metabolização hepática ativa (HepG2/C3A), quanto em células sem metabolização por enzimas hepáticas (leucócitos humanos).

Considerando as promissoras propriedades farmacológicas dos extratos em questão, bem como de alguns dos compostos majoritários já identificados e estudados no contexto farmacológico, é fundamental a ampliação das investigações envolvendo a toxicidade celular e genética desses extratos e seus principais compostos ativos para a compreensão dos potenciais perigos que pode representar para o genoma humano, tanto em ensaios in vitro com células sem capacidade de metabolização com enzimas hepáticas, como posteriormente em ensaios in vivo. Enquanto os referidos estudos não forem desenvolvidos/concluídos, recomenda-se cautela no uso de *R. rosifolius* por seres humanos, frente à toxicidade genética inicialmente observada



ANEXO I

Risk assessment via genotoxicity, metabolism, apoptosis, and cell growth effects in a HepG2/C3A cell line upon treatment with *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves extract

Ana Paula Oliveira De Quadros^{a,b}, Laiza Moura Almeida^{c,d}, Marcel Petreanu^e, Rivaldo Niero^f, Paulo Cesar Pires Rosa^g, Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya^h, Mario Sergio Mantovaniⁱ, Isabel O'Neill De Mascarenhas Gaivão^j, and Edson Luis Maistro^{k,l,m}

^aPost-Graduate Program on General and Applied Biology, São Paulo State University – UNESP – Biosciences Institute, Botucatu, SP, Brazil; ^bDepartamento de Biomedicina, Centro Universitário De Rio Preto – UNIRP – São José Do Rio Preto, SP, Brazil; ^cMarília Medical School, Marília, SP, Brazil; ^dSpeech and Hearing Therapy Department, São Paulo State University – UNESP – Faculty of Philosophy and Sciences Marília, SP, Brazil; ^eDepartment of Biological Sciences, Vale Do Itajaí University (UNIVALI), Itajaí, SC, Brazil; ^fFaculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil; ^gDepartment of General Biology, Londrina State University, Londrina, PR, Brazil; ^hCECAV and Department of Genetics and Biotechnology, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal

ABSTRACT

Rubus rosifolius: Sm. (Rosaceae) is a plant traditionally used in Brazil and some other countries to treat diarrhea, stomach diseases, and as an analgesic, antimicrobial, antihypertensive, and as well as other pharmacological properties. The aim of this study was to examine cytotoxic and genotoxic effects of *R. rosifolius* leaves extract on HepG2/C3A cells and correlate these findings with the expression of mRNA to underlying mechanisms of action. At concentrations between 0.01 and 100 µg/ml, cytotoxic effects were not detected by the MTT assay. This was confirmed by mRNA induction of the CYP3A4 gene (by RT-qPCR assay). However, genotoxic effects occurred at treatments from 1 µg/ml extract (comet and micronucleus test). An increase in the number of cells in S phase was observed at 100 µg/ml, and an elevation in apoptotic cell number was found for all tested concentrations (10, 20, or 100 µg/ml) (cell cycle and apoptosis analysis by flow cytometry). The genotoxicity induced by the extract was the main cause of the rise in the number of cells undergoing apoptosis, as indicated by rise in mRNA of *CASP7* gene, and elevation of cells in the S phase of the cell cycle at the higher tested concentrations, as an attempt to repair genetic damage that occurred. These observations suggest that, despite its pharmacological potential, the use of *R. rosifolius* leaves extract may pose a risk to the integrity of the genetic material of human cells.

ARTICLE HISTORY**KEYWORDS**

Cell cycle; gene expression; genotoxicity; apoptosis; cytotoxicity; rosaceae toxicity; comet assay

Introduction

Herbal medicines have been used since ancient times in search of nature's answers to treat human diseases (Bourhia et al. 2019; Majolo et al. 2020; Tuttis et al. 2018). The use of oils and infusions serves as a basis for pharmaceutical research using isolated or combined plants (Freitas et al. 2020; Orlando et al. 2019; Tariq et al. 2019). Studies showed that approximately 80% of the population in developing countries are dependent upon plants in primary health care, and more than 25% of prescription drugs worldwide are derived directly or indirectly from plants, with 11% being on the list of essential medicines according to the World Health Organization (Hostettmann and Marston 2002; Newman, Cragg, and Snader 2000). Despite

the widespread use of plants in traditional medicine, and their great potential as a source of new drugs, comprehensive investigations were not fully undertaken, since there are approximately 300,000 species of plants on the planet, and only 15% have been studied phytochemically and 6% pharmacologically (Cragg and Newman 2013).


The *Rubus* genus comprises approximately 715 species divided into 12 subgenera which is found on all continents except Antarctica. These plants have been cultivated for centuries, mainly for the consumption of their fruits, but other parts were also utilized for medicinal purposes due to large quantities of tannins (Alves et al. 2014; Finn et al. 2008; Patel, Rojas, and Dacke 2004; Tolentino et al. 2015).




ANEXO II –

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da citotoxicidade, genotoxicidade, monitoramento do ciclo celular, indução de apoptose e expressão gênica, dos extratos de folhas e caules de *Rubus rosaeifolius* em células humanas em cultura.
Pesquisador Responsável: Edson Luis Maistro
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 76581517 3 0000 5406
Submetido em: 13/09/2017
Instituição Proponente: Faculdade de Filosofia e Ciências/ UNESP - Campus de Marília
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Faculdade de Filosofia e Ciências/ UNESP - Campus de Marília



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_991513

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 1
 - Projeto Original (PO) - Versão 1
 - Documentos do Projeto
 - Comprovante de Recepção - Submissã
 - Cronograma - Submissão 1
 - Folha de Rosto - Submissão 1
 - Informações Básicas do Projeto - Subm
 - Projeto Detalhado / Brochura Investigaç
 - TCLE / Termos de Assentimento / Justif
 - Apreciação 1 - UNESP - Faculdade de Filo
 - Projeto Completo

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações
-------------------	----------	---------	----------	-------

LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO

Apreciação	Pesquisador Responsável	Versão	Submissão	Modificação	Situação	Exclusiva do Centro Coord.
PO	Edson Luis Maistro	1	13/09/2017	26/09/2017	Aprovado	Não

Ativar o Windows
Acessar as configurações de segurança



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

PG-BGA