



**unesp**

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



“INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAL GENOTÓXICO E  
CLASTOGÊNICO/ANEUGÊNICO DO EXTRATO DE FRUTOS DE  
*Crataegus oxyacantha*: ANÁLISES *in vitro*”

**ANA PAULA OLIVEIRA DE QUADROS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título  
de Mestre 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  
2016**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

“INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAL GENOTÓXICO E  
CLASTOGÊNICO/ ANEUGÊNICO DO EXTRATO DE FRUTOS DE  
*Crataegus oxyacantha*: ANÁLISES *in vitro*”

ANA PAULA OLIVEIRA DE QUADROS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título  
de Mestre 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  
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. 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.

Investigação de potencial genotóxico e  
clatogênico/aneugênico do extrato de frutos de *Crataegus*  
*oxyacantha* : análises in vitro / Ana Paula Oliveira de  
Quadros. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: Edson Luis Maistro

Capes: 20100000

1. Plantas medicinais. 2. Toxicologia genética. 3.  
Ensaio cometa. 4. Rosácea (Botânica). 5. Extratos  
vegetais.

Palavras-chave: *Crataegus oxyacantha*; Ensaio cometa;  
Mutagênese; Teste de Ames; Teste do micronúcleo.



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



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

## *Agradecimentos*

*Expresso meus sinceros agradecimentos:*

*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 namorado Vinicius por toda a força, companheirismo e apoio durante esta jornada.*

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

*A Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales por ceder seu laboratório para realização de testes juntamente com a Dra Dânia que, gentilmente, cedeu seu tempo e conhecimento para me acompanhar. Amplio meus agradecimentos à todos do laboratório de mutagênese da Unesp de Rio Claro.*

*Ao Juliano, Eduardo e Larissa que me auxiliaram nos experimentos realizados em laboratório.*

*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.*



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



*"Temos o destino que merecemos. O nosso destino está de acordo com os  
nossos méritos".  
Albert Einstein*

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Classes de cometas observadas na microscopia	<b>17</b>
<b>Figura 2:</b>	Formação de micronúcleos e ação da citocalasina B	<b>19</b>
<b>Figura 3:</b>	Parâmetros avaliados no teste de micronúcleo	<b>19</b>
<b>Figura 4:</b>	Flores, folhas e frutos de <i>Crataegus oxyacantha</i>	<b>24</b>
<b>Tabela 1:</b>	Características das cepas de <i>Salmonella</i> usadas no teste de Ames	<b>20</b>
<b>ARTIGO</b>		
<b>Figura 1:</b>	Identificação de Vitexina-4-O-rhamnosideo por cromatografia	<b>53</b>
<b>Figura 2:</b>	Identificação de Vitexina e Isovitexina por cromatografia	<b>53</b>
<b>Figura 3:</b>	Identificação de Hyperosideo por cromatografia	<b>54</b>
<b>Tabela 1:</b>	Dados de migração do DNA (média e desvio padrão) obtidos pelo ensaio cometa na avaliação da genotoxicidade do extrato de frutos de <i>C. oxyacantha</i> em PBMC humano	<b>55</b>
<b>Tabela 2:</b>	Dados de migração do DNA (média e desvio padrão) obtidos pelo ensaio cometa na avaliação da genotoxicidade do extrato de frutos de <i>C. oxyacantha</i> em células HepG2	<b>55</b>
<b>Tabela 3:</b>	Frequência de micronúcleos e índice de divisão nuclear em linfócitos humanos tratados com o extrato de frutos de <i>Crataegus oxyacantha</i>	<b>56</b>
<b>Tabela 4:</b>	Frequência de micronúcleos e índice de divisão nuclear em células HepG2 tratadas com o extrato de frutos de <i>Crataegus oxyacantha</i>	<b>56</b>
<b>Tabela 5:</b>	Taxa de reversão de cepas TA98 e TA100 de <i>Salmonella</i> com ausência e presença de fração metabolizadora tratadas com o extrato de frutos de <i>Crataegus oxyacantha</i>	<b>57</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius

µg/mL – Micrograma por mililitro

µm – micrometro

µM - Micromolar

AA – Ácido araquidônico

ANOVA – *one-way analysis of variance*

Bap – Benzo(a)Pireno

BE – Brometo de etídio

BER – *Base excision repair*

BN – Células Binucleadas

Cm<sup>2</sup> - Centímetros quadrados

CYP – Citocromo P450

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Doxorrubicina

DNA -ÁcidoDesoxirribonucleico

EnC– EnsaioCometa

FBS – Soro bovino fetal

FISH – Hibridização fluorescente *in situ*

HepG2 – Hepatocarcinoma Humano

IDN - Índice de divisão nuclear

LMPA –*Low melting point agarose*

LSP – Linfócitos humanos de sangue periférico

mA – Miliampère

mg – miligramas

mg/kg – miligramas por quilogramas

mL- Mililitro

MMR – *Mismatch Repair*

MMS - Metanossulfato de metila

MN – Micronúcleo

MNS<sub>t</sub>B - Micronúcleo *in vitro* com bloqueio da citocinese

MTT - (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium)

nm – Nanômetro



**NMPA** – Normal melting point agarose

**NO** – Óxido nítrico

**PHA**–Fitohemaglutinina

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RPMI** - *Dulbecco's Modified Eagle's*

**SCGE** - *Single cell gel electrophoresis*

**V** – volts

## Resumo

Cerca de 11% dos medicamentos considerados essenciais pela OMS são derivados de plantas medicinais, daí a importância do desenvolvimento de testes científicos sobre essas plantas, avaliando, além do seu real potencial farmacológico, a genotoxicidade, mutagenicidade, antigenotoxicidade, citotoxicidade, dentre outros, para esclarecer se o uso de tais plantas por seres humanos é seguro. *Crataegus oxyacantha* é uma planta originalmente encontrada na Europa e, devido à suas potencialidades medicinais, já há muito tempo foi introduzida no continente sulamericano. Pertencente à família *Rosaceae*, a árvore forma, na primavera, cachos grandes de flores brancas ou rosas de fragrância agradável, que no outono se transformam em pequenos frutos vermelhos. A importância da *C. oxyacantha* se dá pela presença comprovada de flavonóides, que são conhecidos por sua ação antioxidante. Devido a inexistência na literatura de estudos investigando a toxicidade genética de *C. oxyacantha* para os seres humanos, o presente estudo foi elaborado visando avaliar se o extrato de frutos desta planta apresenta efeitos citotóxico, genotóxico e clastogênico/aneugênico em leucócitos humanos e células HepG2 em cultura, e mutagênico em cepas de *Salmonella typhimurium* (teste de Ames). Os resultados da análise de genotoxicidade mostraram que o extrato não apresentou efeitos genotóxicos nas concentrações de 2,5 e 5,0 µg/ml em ambos os tipos celulares analisados, no entanto, em concentrações acima de 10 µg/ml verificou-se a ocorrência de danos significativos ao DNA. Os resultados do teste do micronúcleo também mostraram que nas concentrações de 10µg/ml e superiores foram observados efeitos mutagênicos nas células estudadas. No teste de Ames, somente na cepa TA98 de *S. typhimurium*, com ativação metabólica, o extrato se mostrou mutagênico. Os dados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que, nas condições do experimento, o extrato de frutos de *C. oxyacantha* apresenta efeito genotóxico e clastogênico/aneugênico em concentrações acima de 10 µg/ml; e pelo teste de Ames, o extrato, após metabolização, apresenta efeitos mutagênicos. Devido ao potencial medicinal desta planta e ao fato de algumas formulações com extratos da mesma já estarem sendo comercializados, os resultados de genotoxicidade positiva obtidos neste trabalho indicam cautela no uso desse extrato, e apontam para a necessidade de mais estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que avaliem a toxicidade genética do extrato de frutos e de outras partes desta planta.

## Abstract

About 11% of medicines considered essential by WHO are derived from medicinal plants, being important to develop scientific tests on these plants, evaluating several aspects as its pharmacological potential, genotoxicity, mutagenicity, antigenotoxicity, cytotoxicity, among others, to clarify if the use of such plants is safe for humans. *Crataegus oxyacantha* is a plant originally found in Europe and due to its medicinal potential, was at long time introduced in the South American continent. Belonging to the Rosaceae family, the tree form in the spring, large bunches of white flowers and pleasant fragrance of roses, which in autumn turn into small red fruits. The importance of *C. oxyacantha* is attributed to the presence of flavonoids as constituents, which are known for their antioxidant activity. Considering the absence in the literature of studies investigating the genetic toxicity of *C. oxyacantha* to humans, this study was designed to evaluate if the fruits extract of this plant present a cytotoxic, genotoxic and clastogenic/aneugenic effects in cultured human HepG2 and leukocytes cells, and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* strains (Ames test). The results of genotoxicity analysis evidenced that the extract showed no genotoxic effects at 2.5 and 5.0 ug/ml concentrations, in both cell types tested, however, at concentrations above of 10 ug/ml significant DNA damage was observed. The micronucleus test results showed that the concentrations above of 10 ug/ml also produced clastogenic/aneugenic effects on the cells studied. The Ames test showed that in the *S. typhimurium* TA98 strain, with metabolic activation of the extract, was observed mutagenic effects. The data obtained in this study allow us to conclude that, under the experimental conditions employed, the fruits extract of *C. oxyacantha* has genotoxic and clastogenic/aneugenic effects at concentrations above of 10 ug/ml; and by the Ames test, the extract after metabolization, has mutagenic effects. Due to the medical potential of this plant and the fact that some formulations with extracts of it are already being marketed, the genetic toxicity observed in this study indicate caution in the use of this extract, and point to the necessity of further studies, both *in vitro* and *in vivo*, to better evaluate the genotoxicity of the fruit extract and other parts of this plant.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	Introdução	
<b>1.1</b>	Mutação e a genética toxicológica	13
<b>1.2</b>	Ensaio “ <i>in vitro</i> ” e a mutagênese	15
<b>1.3</b>	O Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo	16
<b>1.4</b>	O Teste de AMES	20
<b>1.5</b>	Considerações sobre cultura celular	21
<b>1.6</b>	Considerações sobre <i>Crataegus oxyacantha</i>	23
<b>2</b>	Objetivos	25
<b>3</b>	Referências	26
<b>4</b>	Artigo	30
<b>5</b>	Considerações finais	58

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 MUTAÇÃO E A 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). 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 desenvolveram mecanismos para reverter estas mutações tentando assim reparar 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 através de 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, pg 29). Uma falha em qualquer um destes mecanismos pode levar a um processo de carcinogênese.

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).

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 dano 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 (BRUSICK, 1987; ROGERO *et al.*, 2003).

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 (ANVISA, 2013; CANDIDO-BACANI PDE *et al.*, 2011; CHOY, 2001).

## 1.2 Ensaio *in vitro* e a Mutagênese

A mutagênese é a ciência que estuda o processo de indução de danos no DNA pela ação de agentes químicos, físicos e biológicos. A mutação consiste em toda alteração do material genético que não resulta dos processos de segregação ou recombinação, capaz de influenciar ou não a atividade normal da unidade genética onde ocorreu (LEWIN, 2000). Qualquer substância capaz de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação, é considerada antimutagênica (DE FLORA, 1998). Já os chamados agentes mutagênicos alteram a seqüência nucleotídica, podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

Genotoxicidade é um termo amplo e refere-se ao efeito potencial de danos no material genético, que não está necessariamente associado com mutagenicidade. No entanto, testes de genotoxicidade dão uma indicação de danos induzidos no DNA. O ensaio do cometa e do micronúcleo *in vitro* tem grande aceitação na comunidade científica, por essa razão foram utilizados no presente estudo. Além disso, a avaliação de mutagenicidade ou antimutagenicidade *in vitro* apresenta muitas vantagens: (1) facilidade de padronização das condições experimentais (pH, composição do meio de cultura, densidade populacional); (2) o tratamento é possível em qualquer fase do ciclo celular; (3) é econômico e de boa reprodutibilidade; (4) em geral, as células mostram-se mais uniformes quanto ao metabolismo e comportamento; (5) o DNA e a organização dos cromossomos são idênticas às demonstradas *in vivo* (RODRIGUES, 1991 *apud* LUIZ, 2002).

Os testes *in vitro* vêm sendo extensivamente utilizados tanto para identificar agentes genotóxicos como antígenotóxicos. Os ensaios que utilizam células de mamíferos, em especial a de seres humanos, têm se mostrado bastante eficazes para estudos sobre os mecanismos envolvidos na atividade quimioprotetora, já que tais células, diferentemente das procarióticas,

reproduzem algumas das situações observadas *in vivo*, como por exemplo, os sistemas de reparo do DNA e do metabolismo de compostos xenobióticos (WATERS *et al.*, 1996). Além de evitar o uso de animais de experimentação, dentre os aspectos positivos da utilização de ensaios *in vitro* em estudos de genotoxicidade/antigenotoxicidade, estão as possibilidades de se testar um maior número de compostos em menor período de tempo e com variações nos protocolos de tratamento.

Uma das vantagens do uso de sistemas *in vitro* para identificação de agentes mutagênicos e antimutagênicos, é a possibilidade da avaliação mais rápida da ação da substância teste sobre as células e sobre diversos mutágenos com diferentes mecanismos de indução de danos no DNA.

### 1.3 O Ensaio Cometa e o Teste do Micronúcleo

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 um método rápido e sensível para a detecção de danos primários no DNA que tem sido amplamente utilizado na Genética Toxicológica por ser um teste relativamente simples, flexível, de rápidos resultados, onde um pequeno número de células por amostra e pequenas quantidades da substância teste são suficientes para conduzir um experimento (TICE *et al.*, 2000). Segundo 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 de tempo. 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, espermatozóides, bem como tecidos de biópsia; tornando o ensaio uma ferramenta versátil e eficiente.

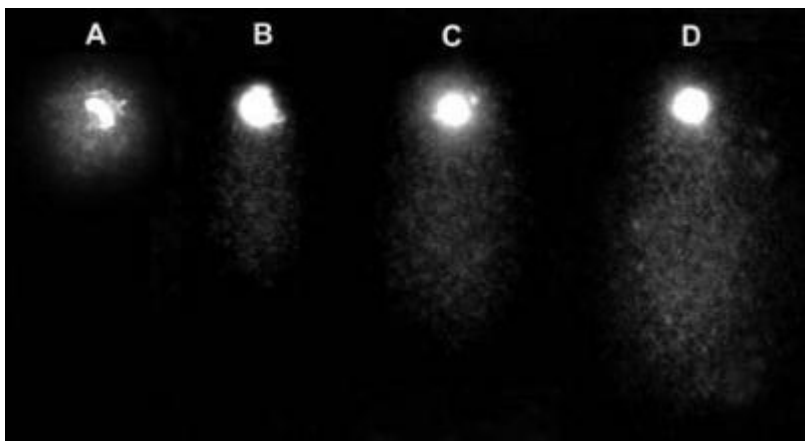
O mecanismo principal, proposto por Östling e Johanson (1984), é que o DNA é organizado em grandes estruturas supercoloidais que, quando separadas por quebras na dupla-fita de DNA, podem migrar para o ânodo através da eletroforese, sendo que a aparência dos nucleóides submetidos ao teste levou Olive (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  $H_2O_2$ . 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) (FIGURA 1):

- Classe 0 – sem dano (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)

\* células apoptóticas e necróticas não são consideradas.



**Figura 1:** 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).

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).

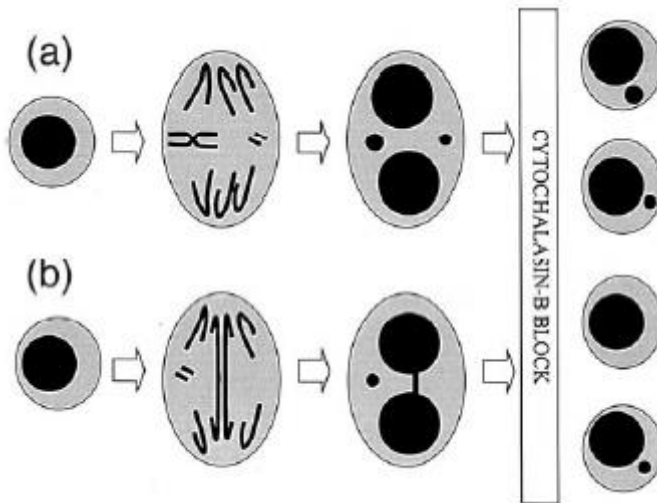
O Ensaio cometa também foi descrito como eficaz para estudos de monitoramento de células germinativas (SPEIT *et al.*, 2009) e pesquisa de estresse oxidativo (COLLINS, 2013).

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).

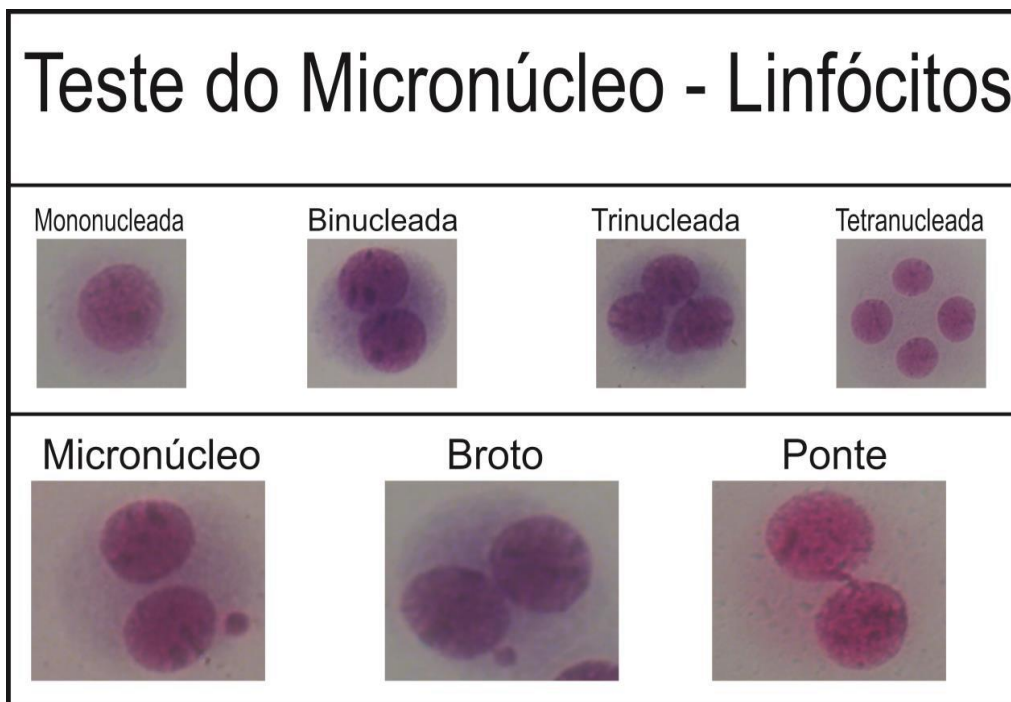
Os micronúcleos são resultantes de dois fenômenos básicos nas células mitóticas (FIGURA 2): quebra cromossômica e disfunção do aparato mitótico. São formados pelos cromossomos acêntricos ou fragmentos cromatídicos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasam na anáfase e são excluídos do núcleo-filho na telófase (FENECH, 2000). Apesar do teste do micronúcleo detectar efeitos clastogênicos (micronúcleo contendo fragmento do cromossomo) ou aneugênicos (micronúcleo contendo cromossomo inteiro), essa diferenciação só pode ser vista através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), 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).

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. Estes são alguns breves relatos da potencial aplicação desta metodologia *in vitro* em ensaios de genotoxicidade/antigenotoxicidade.



**Figura 2:** Formação de micronúcleos e representação com citocalasina B (FENECH, 2000).



**Figura 3.** Teste do Micronúcleo em linfócitos humanos, com os parâmetros que são avaliados (FRODER, 2016).

## 1.4- O Teste de Ames

O teste de Ames ou *Salmonella*/microsoma foi descrito por Ames em 1971 e, posteriormente modificado por Maron e Ames em 1983. O teste se baseia na utilização de cepas de *Salmonella typhimurium* geneticamente modificadas, através da engenharia genética, que perdem a capacidade de sintetizar um aminoácido essencial específico, a histidina e, portanto não são capazes de se proliferar e formar colônias em meio com a ausência deste. Algumas substâncias tem a capacidade de promover uma mutação reversa no gene atingido fazendo com que a célula volte a produzir histidina. Diversas cepas podem ser utilizadas no teste, cada uma delas possui uma mutação diferente em cada operon do gene da histidina, ou seja, essas diferenças permitem diferenciar cada composto em relação ao tipo de mutação causada (MORTELMANS & ZEIGER, 2000). No teste, concentrações da amostra a ser analisada são acrescidas de uma alíquota da cultura de bactéria contendo a cepa selecionada, este mix é incubado e posteriormente semeado em placas contendo meio apropriado, após 48 horas o número de colônias revertentes por placas é contabilizado. Como se sabe que alguns químicos só são ativos após metabolização, o processo é realizado também com a adição de uma fração metabolizadora derivada de fígado de rato (VARGAS *et al.*, 1993).

Linhagem	Mutação	Tipo de mutação	Taxa de reversão espontânea
TA 1535	hisG46	Substituição de pares de base	20-35
TA 1537	hisC3076	Deslocamento do quadro de leitura	5-25
TA 97a	hisG6610	Deslocamento do quadro de leitura	90-180
TA 98	hisD3052	Deslocamento do quadro de leitura	25-75
TA 100	hisG46	Substituição de pares de base	75-225
TA 102	hisG428	Substituição de pares de base	240-320
TA 104	hisG428	Substituição de pares de base	245-475

**Tabela 1:** características das cepas de *Salmonella typhimurium* comumente utilizadas (modificado de UMBUZEIRO, VARGAS, 2003).

Por ser um teste simples, rápido, eficiente, de alta reprodutibilidade e permitir avaliar, inclusive, amostras mais complexas, o seu uso é muito difundido (McCANN *et al.*, 1975; CLAXTON, UMBUZEIRO, DEMARINI, 2010).

Alguns testes genéticos se fazem necessários antes da utilização das cepas no ensaio. Estes testes são realizados visando confirmar as características de cada cepa, imprescindíveis para seu uso. São eles: teste de dependência de histidina, teste de mutação rfa (perda parcial na

membrana de lipossacarídeos), deleção de *uvrB*, presença do plasmídeo *pkm101* (prova de resistência a ampicilina) e prova de reversão espontânea (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

No presente estudo foram utilizadas as cepas TA 100 e TA 98, que apresentam mutações do tipo substituição de pares de bases e *frameshift* (inserção e/ou deleção de pares de bases, mudando a matriz de leitura), respectivamente. Ambas as cepas foram testadas com e sem presença da fração metabolizadora.

### 1.5- Considerações sobre a cultura celular

Muito utilizado por mimetizar situações "*in vivo*" no mecanismo "*in vitro*", o cultivo celular vem sendo usado em estudos no Brasil e no mundo desde o final do século XIX. Este tipo de cultivo deve ser realizado com máxima assepsia e possui algumas limitações que ao longo do tempo estão sendo minimizadas com o uso de suplementos, meios adequados e alterações no pH, na temperatura e na pressão utilizadas, entre outros.

Segundo Rogero (2003), os ensaios "*in vitro*" se tornaram necessários para detecção de toxicidade de substâncias na mesma proporção em que o controle do uso de animais em laboratório para experimentos se tornou mais rigoroso.

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 dano em cultura celular, possivelmente ele também causará algum efeito similar em organismos completos (CARVALHO, 1996). Métodos "*in vitro*" se sobressaem a métodos "*in vivo*" pela possibilidade de 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 (BRUSICK, 1987; ROGERO *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos são realizados primariamente em células de mamíferos (BRUSICK, 1987) o que possibilita a realização de tratamentos e intervenções em diversas fases do ciclo celular, uma vez que apresenta organização do material genético semelhante a células "*in vivo*" (RABELLO-GAY, 1991).

Segundo MURRAY (2010) e TORTORA (2011), as culturas celulares podem ser divididas em três tipos: cultivo primário, cultivo secundário e linhagem contínua. No cultivo

primário as células são diplóides e foram extraídas de órgãos ou tecidos. A sua multiplicação é de 3 a 20 passagens "*in vitro*". No cultivo secundário, as células são também diplóides, mas as passagens podem chegar de 60 a 80 "*in vitro*". Já na linhagem contínua as células são heteroplóides, e são capazes de ser propagadas em um número indefinido "*in vitro*".

As células humanas mais utilizadas são células mononucleares, principalmente linfócitos. Segundo alguns autores este uso se deve ao fato de linfócitos serem células primárias e serem de fácil manipulação em cultura de suspensão (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2011).

Além das células humanas, as células de roedores também são muito usadas, mais comumente as HTC (Hepatoma Tissue Culture). As HTC são células metabolizadoras advindas de fígado de ratos que expressam as enzimas de fase I e II do processo de metabolização de substâncias (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Ou seja, com o uso deste tipo de células é possível se analisar a influência da metabolização na ação citotóxica das substâncias.

Entre as HTCs, uma das mais utilizadas são as células HepG2. Estas células foram isoladas pela primeira vez em 1979, a partir de um hepatoblastoma de um menino argentino de 11 anos de idade (KNASMULLER *et al.*, 1998). Este tipo celular é conhecido por apresentar morfologia semelhante ao parênquima hepático, assim como manter a produção e secreção de enzimas e fatores característicos de células normais do fígado humano, o que permite a metabolização da maioria dos mutágenos, sejam eles diretos ou indiretos (KNASMULLER *et al.*, 1998; VALENTIN- SEVERIN *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2012). As células HepG2 conservam atividades das enzimas de fase I, como citocromo p450, CYP1A1, CYP1A2, CYPP2B E CYPP2E1, e de fase II, como glutatona, sulfotransferases e glucoranosiltransferases, que estão envolvidas na ativação de substâncias que agem no DNA (UHL, HELMA E KNASMULLER, 1998).

Em 2003, Valentin-Severin e seus colaboradores realizaram testes usando as células HepG2 e HTC, muito usadas em experimentos "*in vitro*". As diferenças nos efeitos observados em cada teste fizeram com que eles avaliassem qual seria a melhor droga controle positivo para cada teste. No ensaio cometa, o MMS ou metassulfato de metila se mostrou mais eficiente sendo este um mutágeno direto. Já no ensaio do micronúcleo, onde podem ser vistos quebras ou efeitos aneugênicos nos cromossomos, a droga que melhor atuou foi o benzo-alfa-pireno.

## 1.6 Considerações gerais sobre *Crataegus oxyacantha*

*Crataegus oxyacantha* é uma árvore pertencente à família Rosaceae, que atinge o comprimento de 25 a 30 metros de altura. Primariamente era encontrada na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, mas já é encontrada em outros continentes, como o sulamericano. Na primavera forma cachos grandes de flores brancas ou rosas de fragrância agradável, que no outono se transformam em pequenos frutos vermelho brilhantes (Figura 4) (WEIHMAYR & ERNST, 1996).

Seus frutos têm sido usados há muito tempo como diurético, para o tratamento de dispnéia e cálculo renal (RIGELSKY *et al.*, 2002), mas também são encontrados estudos mostrando seus efeitos sedativos e ansiolíticos, principalmente associado à outros extratos (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Contudo, a maioria dos estudos farmacológicos nesta espécie fornecem evidências de suas propriedades cardiotônicas (WANG *et al.*, 2013, KANMANTHAREDDY *et al.*, 2014). Em 2012, por exemplo, Vijayan e seus colaboradores realizaram um estudo utilizando ratos wistar com dano no miocárdio induzido por isoproterenol para comprovando que o extrato de *Crataegus oxyacantha* apresenta efeito protetor contra a inflamação induzida e apoptose associada. Já em 2014, utilizando-se do mesmo tipo de animal, Alp e seus colaboradores provaram que o extrato alcoólico de *C. Oxyacantha* produz, nas condições impostas por eles, efeitos benéficos contra arritmias induzidas por digoxina, porém deixam clara a necessidade de mais estudos para que este fitoterápico seja indicado como tratamento.

As investigações sobre a planta em questão geralmente se concentram na identificação e quantificação de flavonóides e antocianinas, sendo que os principais flavonóides identificados são hiperosídeo, vitexina e seus derivados (EDWARDS, 2012). Com base nestes estudos, a atividade cardiovascular protetiva primária de *C. oxyacantha* é generalizadamente atribuída aos seus constituintes flavonóides, particularmente protoantocianidinas oligoméricas (PCOs). Estas PCOs estão grandemente concentradas nas folhas, frutos e flores e são responsáveis pelos pigmentos que dão cores aos frutos. Devido ao alto conteúdo de flavonóides do extrato de *Crataegus sp.*, particularmente das PCOs, este apresenta uma atividade antioxidante significativa. Alguns estudos têm mostrado que o extrato reduz o estresse oxidativo no miocárdio após

reperusão e parece inibir a apoptose, resultando em um efeito cardioprotetor (JAYALAKSHMI *et al.*, 2004; JAYALAKSHMI *et al.*, 2006).



**Figura 4:** Flores, folhas e frutos de *Crataegus oxyacantha* (ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW, 2010).

Alguns estudos com extratos de frutos de outra espécie do gênero *Crataegus* (*Crataegus microphylla*) revelaram, recentemente, que estes foram capazes de proteger linfócitos humanos em cultura de possíveis efeitos genotóxicos induzidos por radiação (HOSSEINIMEHR *et al.*, 2008; HOSSEINIMEHR *et al.*, 2009). Este gênero é considerado uma das mais antigas fontes para a farmacologia e é amplamente prescrito e utilizado na medicina (BAHORUN *et al.*, 2003), o que justifica a necessidade de desenvolvimento de estudos envolvendo a análise da citotoxicidade e toxicidade genética de extratos de plantas deste gênero.

## 2. Objetivos

Considerando a importância da planta *Crataegus oxyacantha* como medicamento alternativo natural para seres humanos, e a inexistência de estudos avaliando a potencial toxicidade genética da mesma em células eucariontes, o presente estudo foi elaborado visando:

### **De forma Geral:**

Investigar o potencial citotóxico, genotóxico e clastogênico/aneugênico do extrato de frutos de *Crataegus oxyacantha*, em células humanas *in vitro*.

### **De forma Específica:**

Determinar os constituintes químicos majoritários presentes no extrato.

Avaliar a viabilidade celular e a citotoxicidade do extrato de frutos de *Crataegus oxyacantha* em células HepG2 e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano, pela coloração com azul de tripan e pelo teste do MTT;

Avaliar a viabilidade e citotoxicidade do extrato de frutos de *Crataegus oxyacantha* em cepas TA 98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium*;

Avaliar o potencial genotóxico e clastogênico/aneugênico deste extrato em células HepG2 (com enzimas metabolizadoras do fígado) e PBMC humanos (células sem enzimas de metabolização hepática) *in vitro*, por intermédio do ensaio cometa e do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese;

Avaliar o potencial mutagênico do presente extrato através do Teste de Ames com presença e ausência de metabolização.

### 3-Referências

- ANVISA, Brasília, 2013. Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2. **Anvisa**, Brasília.
- ALP, H.; SONER, B. C.; BAYSAL, T.; SAHIN, A. S.. Protective effects of Hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) extract against digoxin-induced arrhythmias in rats. **The Anatolian Journal of Cardiology**.2015;15(12): 970-975
- BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCann, J.; Pike, M.C..An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. **Mutation Research**.1982;97, 267–281.
- CLAXTON, L.D.; UMBUZEIRO, G.A.; DEMARINI, D.. The *Salmonella* Mutagenicity Assay: The Stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. **Environmental Health Perspectives**, v.118, p.1515-1522, 2010.
- CHANG, W.T.; Dao, J.; Shao, Z.H.. Hawthorn: Potential roles in cardiovascular disease. **American Journal of Chinese Medicine**. 2005, 33: 1-10.
- CHOY, W.N.. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assesment. **Marcel Dekker, Inc**, New York: 2001.
- COLLINS, A.. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**. v.26, p.249-261, 2004.
- CORTÉS-GUTIÉRREZ, E.I.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M.I.; FERNÁNDEZ, J.L.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GOSÁLBEZ, A.; GOSÁLVEZ, J.. New Application of the Comet Assay: Chromosome–Comet Assay. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v. 59, p. 655 – 660, 2011.
- DANIELE, C.; MAZZANTI, G.; PITTLER, M.H.; *et al.*. **Adverse-event profile of *Crataegus* spp.: a systematic review**.Drug Saf 2006;29:523-35
- EDWARDS, J.E.; BROWN, P.N.; TALENT, N.; DICKINSON, T.A.; SHIPLEY, P.R.. **A review of the chemistry of the genus *Crataegus***. Phytochemistry. V.79. pg 5-26, 2012.
- FAIRBAIRN D. W.; OLIVE P.L.; O’NEILL K.L. The Comet assay: a comprehensive review, **Mutation Research**. v. 339, p. 37-59, 1995.
- FENECH, M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. **Methods in Molecular Biology**, v.410, p.185-216, 2008.

FENECH, M.. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 600, p. 58-66, 2006.

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

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**. v. 14, p. 605-612, 1999

FRODER, J.G.. Estudo de genotoxicidade e citotoxicidade da Indometacina Nanoencapsulada *in vitro*.2016. 67f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)- Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade estadual de São Paulo, Botucatu, 2016.

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.

JAYALAKSHMI, R.; DEVARAJ, S.N.. Cardioprotective effect of tincture of *Crataegus* on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 2004;56(7):921–926.

JAYALAKSHMI, R.; THIRUPURASUNDARI, C.J.; DEVARAJ, S.N.. Pretreatment with alcoholic extract of shape *Crataegus oxycantha* (AEC) activates mitochondrial protection during isoproterenol—induced myocardial infarction in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 2006;292(1-2):59–67

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v.363, p.89-96, 1996.

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

MARON, D.M.; AMES, B.N.. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, p.173-214, 1983.

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.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsoma test: Assay of 300 chemicals. **Medical Science**, v.72, p.5135-5139, 1975.

MORTELMANS, K., ZEIGER, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**. 455, 29–60.

OECD TG 487. In vitro mammalian cell micronucleus teste. **OECD guideline for the testing of chemicals**. Available at: <http://oecd.org/env/ehs/testing/TG487Oct2012update29oct.pdf>

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.

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

RIGELSKY, J.M.; SWEET, B.V.. Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses. **American Journal of Health-System Pharmacy**. 2002;59(5):417–422

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.

SILVA JUNIOR, F.M.R.; VARGAS, V.M.F. Using the *Salmonella* assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil. **Mutation Research**, v.673, p.116-123, 2009.

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.

STOPPER, H.; MULLER, S.O.. Micronuclei as a biological end point for genotoxicity: a mini review. **Toxicology In Vitro**. 1997, v.11, 661–667.

TICE *et al.* Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

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

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.

VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; HENRIQUES, J.A.P.. Mutagenic activity detected by Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research**, v.319. p.31-45, 1993.

VIJAYAN, N.A.; THIRUCHENDURAN, M.; DEVARAJ, S.N.. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of *Crataegus oxyacantha* on isoproterenol-induced myocardial damage. **Molecular cell biochemistry**. V.367. p.1-8, 2012.

WANG, J.; XIONG, X.; FENG, B.. Effect of *Crataegus* usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2013;2013:16 pages.149363

WEIHMAJR, T.; ERNST, E.. Therapeutic effectiveness of *Crataegus*. **Fortschr Medicine**. 1996;114:27–29

ZHANG, Z.; CHANG, Q.; ZHU, M.; HUANG, Y.; HO, W.K.; CHEN, Z.Y.. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 2001;12:144–152

#### 4- ARTIGO

##### **Fruits extract of the medicinal plant *Crataegus oxyacantha* presents genotoxic and mutagenic effects in human cultured cells**

Ana Paula Oliveira de Quadros<sup>a</sup>, Dania Elisa Christofolletti Mazzeo<sup>b</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>b</sup>, Fábio Ferreira Perazzo<sup>c</sup>, Paulo Cesar Pires Rosa<sup>d</sup>, Edson Luis Maistro<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Biociências, Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Botucatu, SP, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Diadema, SP, Brasil.

<sup>d</sup> Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP, Brasil.

<sup>e</sup> Universidade Estadual Paulista – UNESP – Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia. Marília, SP, Brasil.

##### **Corresponding author:**

Prof. Dr. Edson Luis Maistro, Departamento de Fonoaudiologia, Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. Hygino Muzzi Filho, 737. Caixa Postal 18. Campus Universitário. CEP 17525-900 - Marília, SP – Brasil. E-mail:edson.maistro@marilia.unesp.br. Telefone: + 551434021324. Fax: + 551434021302.

## ABSTRACT

*Crataegus oxyacantha* is a plant that belongs to the Rosaceae family also being known by the common names of "English hawthorn, haw, maybush, and whitethorn." It has a long history of use as a medicinal plant and has been used to treat digestive disorders, hyperlipidemia, dyspnoea, to promote diuresis, to prevent kidney stones, among others. However, the major use of this plant has been in the treatment of cardiovascular disorders. Due to the absence in the literature of studies investigating the genetic toxicity of *C. oxyacantha*, this study was designed to evaluate if the fruit extract of this plant has a cytotoxic, genotoxic and clastogenic/aneugenic effects in leukocytes and HepG2 human cultured cells, and mutagenic effects in TA100 and TA98 strains of *Salmonella typhimurium* bacterium. Genotoxicity analysis showed that the extract presented no genotoxic effects at concentrations of 2.5 and 5.0 µg/mL in both cell types examined, however, at concentrations above of 10 µg/mL (10, 50, 100 µg/ml) significant DNA damage was observed. The micronucleus test also revealed that the concentrations of 10 µg/mL and higher showed clastogenic/aneugenic effects on the cells studied.

In the Ames test, the extract showed mutagenic effects in the TA98 strain of *S. typhimurium* with metabolic activation. The data obtained allow us to conclude that, under the experimental conditions, the fruit extract of *C. oxyacantha* has genotoxic and clastogenic/aneugenic effects in human cultured cells, and after metabolization has mutagenic effects in bacteria cells.

**Keywords:** Comet assay, micronucleus test, Ames test, Mutagenic effects, Hawthorn, Rosaceae.

## 1 - INTRODUCTION

*Crataegus oxyacantha* is a plant belonging to the Rosaceae family that reaches a length of 25 to 30 meters. It was primarily found in Europe, North America and West Asia, but due to their medicinal potential, today can be found in other continents such as South American. During the spring period, form large white or pink inflorescences with characteristic aroma; in the fall, these floristic clusters become into small shiny red fruits(1).

Its fruits have been used for long time as a diuretic, for the treatment of dyspnea and renal calculus, but also can be found studies showing its sedative and anxiolytic effects(2). However, most of the pharmacological studies on this specie provide evidence of their cardiotoxic properties(3, 4). The protective primary cardiovascular activity of *C. oxyacantha* is, in general, attributed to its flavonoids constituents, particularly oligomeric protoantocianidins (OPs).

These OPs are largely concentrated in the leaves, fruits and flowers and are responsible for the pigments that give color to fruits. Due to the high content of flavonoids in *Crataegus* sp, particularly OPs, they presents a significant antioxidant activity. Some studies have shown that extracts of this plant reduces oxidative stress in the myocardium after reperfusion and appears to inhibit apoptosis, resulting in a cardioprotective effect(5).

Studies on fruit extracts of other *Crataegus* species (*Crataegus microphylla*) revealed that they have been able to protect cultured human lymphocytes against the genotoxic effects induced by radiation (6-8). *Crataegus* genus is considered one of the oldest sources for pharmacology and is widely prescribed and used in folk medicine.(9)

For the marketing of a product, natural or not, some tests are needed to investigate its effectiveness and safety. Among the safety tests, micronucleus test, comet assay and Ames test are recommended by regulatory international agencies to toxicological evaluation of natural products (10, 11).

Our literature review showed that they are very few studies evaluating the genetic toxicity of *C. oxyacantha* extracts. Tabach et al. (12) developed preclinical toxicological assessment of a

phytotherapeutic product – CPV, consisting of dry aerial parts of *C. oxyacantha* (26.7%), *Passiflora incarnata* (33.3%) and *Valeriana officinalis* (40%). The authors evaluated parameters such as weight, behavior, estrous cycle, teratogenic and mutagenic effects, using dogs, rats, mice and bacteria (Ames test). All the results reported were negative, indicating that complex mixture CPV devoid of risk for human beings.

Considering the widespread popular use of aerial parts extract of *C. oxyacantha*, and the lack of studies evaluating the genetic toxicity of fruit extract of this plant, this study was performed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and clastogenic/aneugenic potential of this extract *in vitro*, in human leukocytes and HepG2 cells, as well as its mutagenic potential in the bacteria cells.

## 2 – MATERIALS AND METHODS

### 2.1- Botanical material

*C. oxyacantha* fruits were collected in Turkey and purchased by certified distributor in Brazil. A sample voucher was deposited in phytochemicals Laboratory of José do Rosário Vellano University, Alfenas town, Minas Gerais state, under the number LFF00297. Dried and powdered fruits of *Crataegus oxyacantha*, in a ratio of herbal drug to drug preparation of 4-7:1, were exhaustively extracted at room temperature with methanol 70% v/v (r.t.). The macerated was filtered and concentrated under reduced pressure, using a rotative evaporator, furnishing the crude methanolic extract (MeOH).

### 2.2- Phytochemical analysis of extract

The methanolic extract 70% was analyzed using liquid chromatography attached to a mass detector. The chromatographic conditions used was: C18 column (100 x 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , temperature 30 °C, injection volume 2  $\mu\text{L}$ , using gradient mode for the mobil phase with mixture I (water: THF: formic acid 890:90:20) and mixture II (methanol:acetonitrile:formic acid 400:400:200) over a 0.2 mL/min flow. A triple quadrupole detector operating with eletrospray ionization source in the negative mode (ESI -), with dessolvation temperature at 300 °C e source 120 °C, over a m/z 100 to m/z 1000 range of evaluation.

The solutions were directly infused into the mass spectrometer electrospray ionization source (ESI). The ESI-MS and ESI-MS/MS were acquired using the negative mode, dessolvation and source temperature were 300 °C and 120 °C, respectively, and in a range of m/z 100 to m/z 1000. The chromatographic separation was performed using a 2.1 x 100 mm C18 column packed with 1.7  $\mu\text{m}$  particles (Zorbax XDB C18, Agilent) at temperature 30°C. The mobile phase used in gradient mode consisted of water:tetrahydrofuran:formic acid 0.1%, 890/90/20 v/v/v as mobile phase A and methanol:acetonitrile:formic acid 0.1%, 400/400/200 v/v/v as mobile phase B in follow gradient: (0-20 min) 50% B, (20-40 min) 100% B and (40-45 min) 100% A. The flow rate was 0.2 mL/min at room temperature and the injection volume was 2  $\mu\text{L}$ .

Equipment: The UPLC used consisted of a Waters Acquity UPLC. A Waters triple-triple TDQMS/MS mass spectrometer with an electrospray ionization source (ESI) was used as a detector. The sequential mass analysis used Argonium as collision gas. Analyst software Masslynx was used for the control of equipment, acquisition and data analysis. The analyses were monitored in the full scan mode and the mass lines intended to be analyzed were chosen for dissociation induced by collision.

### 2.3- Human cells cultured

Mononuclear cells from peripheral blood (PBMC) used in this study were obtained by venipuncture from two healthy volunteers (a man and a woman aged below 25 years old), according guideline of OECD (13). Donors of peripheral blood provided written informed consent at the time of donation, as determined by the Ethics Committee at the time of blood donation. HepG2 cells (human hepatoma cell line) were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro, Brazil). PBMC were maintained in 25 cm<sup>2</sup> cell culture flasks containing RPMI medium, whereas HepG2 cells were grown in DMEM medium, both supplemented with antibiotics and 10% fetal bovine serum. Cultures were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% relative humidity, with complete asepsis. This study was approved by the Human Ethical Committee of the Universidade Estadual Paulista (UNESP), in Marília town, Brazil, on December 4, 2013 (protocol 0839/2013).

#### 2.4- Cell viability and cytotoxicity determination

In this study, the test used for cell viability analysis was trypan blue staining, which evaluates the integrity of the cell membrane (14). Using a 24 well plate, were added  $2 \times 10^5$  cells in each well. The concentrations tested were 2.5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 1000; 1250; 2500 and 5000 ug/mL. The culture plates were maintained in an incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The cellular viability test was done for both two cell types, according to Strober(15). The own respective culture medium was used as negative control, and Triton X-100 diluted in medium without fetal bovine serum culture was used as positive control. Each concentration was tested twice, and each test performed in triplicate. After 24 hours of cell culture in the presence of the test substance, cells were harvest and analyzed in common optical microscope, using Neubauer

chamber as base. Inviably cells could be seen blue stained, being counted 100 cells per well of the plate.

To assess the cytotoxicity of the extract, MTT test (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium) in HepG2 cells was used, as described by Mosmann(16) with some modifications. The test estimates the percentage of cells that were able to transform the MTT into formazan, i.e., what cells percentage is still alive. This transformation can be observed by the appearance of the purple solution, due to the mitochondria metabolism. In them, there is a reduction that makes use of NADH and similar molecules to electron transfer. With this, there is the formation of a product which precipitates and accumulates at the bottom of each well. For the precipitate dissolution, DMSO (dimethyl sulfoxide) was added to the medium, and the plate was read by particular software applied to a spectrophotometer (17).

To perform the MTT assay,  $1 \times 10^5$  cells were added to each well and the volume was completed to reach a final volume of 2ml. After 24 hours incubation, 1.4 mL medium was withdrawn. So, an increase of 20 microliters of each test extract concentration was made and the volume was again completed to 2 mL. Controls were the same used in the trypan blue staining test. After 24 hours of incubation, 1.4 mL of medium was removed and 200 microliters of MTT was added in each well. The plate was incubated again for a further 4 hours, then MTT was removed and 200 microliters of DMSO was added. After 5 minutes, the plate was read at a spectrophotometer, using a 540 nm filter.

## 2.5- Comet assay

The alkaline comet assay was performed according to Tice et al. (18). An aliquot of  $2 \times 10^5$  cells was plated into 24-well plates in 2 mL of the respective culture medium per well at

37°C and incubated for 4 h with the extract, and the concentrations used were 2.5, 5, 10, 50 and 100 µg/ml, chosen on the basis of cell viability and cytotoxicity tests. MMS at 75 µM was used as positive control and culture medium as negative control. The slides were prepared by adding 20 µL of cell suspension with 120 µL of low-melting-point agarose (LMP) in pre-gelatinized slides, being kept at 4°C for 20 min. The coverslips were removed and slides were then immersed in cold, freshly prepared lysis buffer consisting of 89 mL stock solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 nM Tris, pH 10) plus 1 mL Triton X-100 and 10 mL DMSO, at 4°C for 1 h. Subsequently, the slides, always protected against light, were immersed into a cold high-pH (>13) electrophoresis buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA-pH 10) for 20 min, for DNA denaturation. Electrophoresis was carried out in an ice bath (4°C) for 20 min at 25 V and 300 mA (0.722 V cm<sup>-1</sup>). The slides were then submerged in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature, and fixed in 100% ethyl alcohol for 10 min. The slides were dried and stored at least for an overnight before staining. For staining, slides were rinsed in distilled water, covered with 30 µL of 1 x ethidium bromide staining solution, and covered with a coverslip. The analysis was done immediately at 400x magnification using a fluorescence microscopy with a 515-560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter. All experiments were performed three times and in duplicate.

The extent and distribution of DNA damage indicated by the Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) assay was conducted by examining at least 100 randomly selected and non-overlapping cells (50 cells per coded slide) per culture well in a blind analysis. These cells were scored visually, according to tail size, into the following 4 classes: class 0- no tail; class 1- tail shorter than the diameter of the head (nucleus); class 2- tail length 1 to 2 times greater than the diameter of the head; and class 3- tail length more than twice the diameter of the head. Comets with no heads with nearly the entire DNA in the tail or with a wide tail were excluded from the evaluation because these probably represented dead cells (19-21). The score of each

treatment was obtained by multiplying the number of nucleoids observed in each damage class by the value of the class (0, 1, 2 or 3).

## 2.6 - Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) test

This test was performed based on the protocol described by Fenech (22) and revised and standardized recently by the OECD TG 487(13). The cells were cultured in 25cm<sup>2</sup> flasks and treated with the same five concentrations evaluated by the comet assay. Positive control was MMS 150 µM for leukocytes and Benzo(a)pyrene 2 µM for HepG2 cells, and negative control was the own culture medium.

For the test using leukocytes, whole blood (0.4ml) was added into 5ml of culture medium (RPMI) supplemented with 10% fetal bovine serum, plus phytohemagglutinin (PHA) at concentration of 10 µL/mL to stimulate mitogenesis, and the culture flasks were incubated at 37°C, under 95% air and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator for 72 hours.

Four hours after starting the cultures, cytochalasin B (6 µg/mL) was added to each culture flask in order to block cytokinesis. Four hours after cytochalasin B addition human leukocytes were treated with the five different concentrations of the test extract. The cells were harvested by centrifugation (5 min at 850 x g), and pellets were resuspended in a chilled hypotonic solution of 0.075 M KCl for 5 min. Then, cells were washed once with 5 mL of cold methanol:acetic acid solution (3:1, v/v). The fixation procedure was repeated three times. Formaldehyde (1%) was added after the last fixative to preserve the cytoplasm. The cell suspension was placed onto slides and stained with 5% Giemsa dye diluted in phosphate buffer (pH 6.8) for 5 min.

In the micronucleus test using HepG2 cells, culture flasks (performed in triplicate) were incubated for 24 hours for cell growth. Then, the cells were washed again and incubated with the five concentrations of the extract for a period of 24 hours. After this time, the cells were washed

and incubated with cytochalasin B for more 28 hours. After this period, the protocol was the same described for the leukocytes. For the MN quantification of the cells on the slides, was used a light microscope (Zeiss, Primo Star), being scored 1000 binucleate cells per culture flask at 100x magnification (13, 23). As a measure of cytotoxicity, the nuclear division index (NDI) was calculated according the formula  $NDI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$ , where M1-M4 indicate the number of cells with 1-4 nuclei on 500 cells counted (N) (for each culture flask).

## 2.7 - Ames test

*C. oxyacantha* fruit extract was evaluated in a bacterial mutation assay system, using the *Salmonella typhimurium* tester strains TA98 (frameshift) and TA100 (base-pair substitution) using pre-incubation methodology, with (+S9) and without (-S9) metabolization (24). Bacteria strains were kindly provided by Dr. B.N. Ames (Berkeley, CA, USA). The strains were grown overnight from frozen cultures for 12-14 h in Oxoid Nutrient Broth No. 2. The metabolic activation mixture (S9 fraction), prepared from Sprague-Dawley mice's livers treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 (500 mg/kg), was freshly prepared before each test. The metabolic activation system consisted of 4% S9 fraction, 1% 0.4 M MgCl<sub>2</sub>, 1% 1.65 M KCl, 0.5% 1 M D-glucose-6-phosphate disodium and 4% 0.1M NADP, 50% 0.2 M phosphate buffer and 39.5% sterile distilled water (24). For the mutagenic assessment, six different concentrations of the extract (2,5; 5; 10; 100; 250 e 500 µg/mL/plate) were tested. The concentrations of the samples were selected based on preliminary toxicity test that determined the highest non-toxic concentration and the lowest toxic concentration. Samples were considered toxic when a thinning of the auxotrophic background (*i.e.* background lawn), accompanied by a decrease in the number of histidine revertants (His+).

The concentrations of the test substances were added to 0.5 mL of 0.2 M phosphate buffer or to 0.5 mL of 4% S9 mixture, with 0.1 mL of bacterial culture and then incubated at 37°C for 20-30 min. Two milliliters of surface agar were added, the tubes were mixed, and the mixture was poured into a Petri dish containing 20 mL of minimal agar. The Petri dishes were incubated at 37°C for 66 h and the His<sup>+</sup> revertant colonies were counted manually. The test was performed in triplicate. Distilled water was used as negative control. The mutagen used as positive control in the tests without S9 mix was 4-nitroquinoline N-oxide (4NQO). For the tests carried out in the presence of S9 mix, the positive control were 2-anthramine (2-AA).

## 2.7- Statistical analysis

The results obtained in the CBMN and comet assays were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by t-Students test (CBMN) and Tukey test (comet assay). The GraphPad Prism® software (version 5.02) was used to perform statistical analysis. In both tests, the results were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

In the AMES test, the data obtained were analyzed with the statistical software package Salanal 1.0 (U.S. Environmental Protection Agency, Monitorin Systems Laboratory, Las Vegas, NV, from the Research Triangle Institute, RTP, NC, USA). The data (revertants/plate) were assessed by means of the analysis of variance (ANOVA) using the Bernstein model (25), followed by linear regression.

## 3- RESULTS

The total content of flavonoids observed for *C. oxyacantha* fruit extract was 2.7%, by performing chromatographic analysis. The four major compounds of the extract were identified

and quantified: vitexin (m/z 431.2) 0.10%, isovitexin (m/z 431.2) 0.14%, hyperoside (m/z 463.10) 0.63%, and vitexin-2-O-rhamnoside (m/z 577.31) 1.79%. The vitexin-2-O-rhamnoside was the major compound and transition was monitored by  $577.31 > 292.80$  m/z, which refers to the loss of sugar moiety, rhamnoside, followed by loss of  $C_4H_8O_4$ ,  $[M - H]^- = 577.31$ ;  $[M - H - C_6H_{12}O_5]^- = 413.25$  and transition  $[M - H - C_6H_{12}O_5 - C_4H_8O_4]^- = 292.83$  (Figure 1a-c).

Cell viability determination by trypan blue staining tested the extract concentrations of 2.5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 1000; 1250; 2500 and 5000  $\mu\text{g/mL}$  in both, leukocytes and HepG2 cells. In the assessment with leukocytes, extract concentrations above 100  $\mu\text{g/mL}$  showed less than 80% of viable cells, while for HepG2 cells, a decrease of viability was observed from the 250  $\mu\text{g/mL}$  concentration (data no shown). The cytotoxicity analysis performed by the MTT test showed the same results observed with the trypan blue test. So, the results obtained by these assays allowed us to choose the extract concentrations of 2.5; 5; 10; 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  to assess the genotoxic and clastogenic/aneugenic potential of the extract. The cytotoxicity test performed in TA98 and TA100 *Salmonella* strains allowed us to select the following concentrations: 2.5; 5; 10; 100; 250 and 500  $\mu\text{g/mL}$ .

The results of the genotoxic evaluation of the extract using the comet assay are shown in Tables 1 and 2. As expected, when positive control was compared with negative control, a statistically significant difference was observed, confirming the efficiency of the test in detecting DNA damage agents. Significant increases in the total number of cells with DNA damage and scores were observed in cells treated with concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$  and superior. In the cells that presented DNA damage, the majority showed minor damage (class 1). However, in the cells treated with the concentrations of 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$  of the extract, the DNA damage class 2 were higher. The results observed in leukocytes treated with the extract were the same observed in HepG2 cells (Table 2).

The results of the CBMN test are shown in Tables 3 and 4. The assay showed that the extract at the concentrations of 10 µg/mL and higher resulted in a statistically significant increase in the number of micronucleated binucleate cells, when compared to the negative control. This effect was observed in both, leukocytes and HepG2 cells, however, in HepG2 cells the frequency of micronucleated cells was even higher (Table 4).

Table 5 shows the number of *Salmonella typhimurium* colonies revertants, strains TA98 and TA100, per plate, after treatment with the test extract, in the presence (+S9) and absence (-S9) of metabolic activation. The mutagenicity test showed that all tested concentrations of the extract, after metabolization by the S9 fraction, produced mutagenic effects in TA98 strain. On the other hand, the extract without S9 fraction produced no mutagenic effect in both strains.

#### 4 - DISCUSSION

Despite the *C. oxyacantha* be a shrub native to Europe, it was spread by many other countries due its medicinal potential. Extracts of this plant, especially leaves and flowers, and more recently fruits, have been used against several illness that affect the human population, especially those related to the heart problems (2, 26-29). Curiously, our literature review revealed that, although formulations of this plant has been used in traditional medicine over the course of time, there are no studies evaluating the genetic toxicity potential of them. Therefore, this study was conducted to fill this gap in the literature.

The cell viability and cytotoxicity tests of *C. oxyacantha* fruit extract showed that more than 100 µg/mL concentration of the extract resulted in a decrease in cell viability and/or population of human cells in culture, and concentrations above 500 µg/mL were cytotoxic to the

TA98 and TA100 strains of *Salmonella*. In animals, aerial parts extracts of *Crataegus* have shown low toxicity, with LD50 of 25 mg/kg (30).

According to Fenech (31), the assessment of the DNA damage provide important responses in relation to the mutagenic effect of substances, as the mutational process is crucial with regard to carcinogenesis. With this concern in mind, the present study evaluated the genetic toxicity of the extract in question through three important tests used in toxicological genetics.

The first assay was the alkaline comet assay, which detect single and double stranded breaks in DNA that may be repaired or no, resulting in no persistent effect or may be fixed into a mutation (13, 18). The results obtained in the present study showed that extract concentrations from 5 µg/mL produced genotoxic effects in both human cell types analysed.

The second cytogenetic assay used in this study was the CBMN. The test is based on detecting micronuclei in the cytoplasm of interphase cells. Such elements are caused by chromosome fragments devoid of centromere (clastogenic effect), as well as whole chromosomes due to some interference with the mitotic apparatus (aneugenic effect) (13, 22, 32). The data obtained in our present study showed that the fruit extract also produced clastogenic and/or aneugenic effects in the both cultured human cells, at 10 µg/mL concentration and higher.

The last genetic assay used in this study was the *Salmonella*/microsome assay (Ames test). The test uses amino-acid requiring strains of *S. typhimurium* to detect point mutations, which involve substitution, addition or deletion of one or a few DNA base pairs (24). Our study showed that TA98 strain, after extract metabolization by S9 fraction, presented a statistically significant increase in the number of revertants colonies. These data indicate that the chemical components of the extract, after undergoing metabolism, could form mutagenic products capable of causing insertion and/or deletion of DNA base pairs (frameshift mutations).

Tabach et al. (12) developed a preclinical toxicological evaluation of a phytotherapeutic product denominated CPV, which consists of *C. oxyacantha* aerial parts extract (26.7 %) in association with *Passiflora incarnata* (33.3 %), and *Valeriana officinalis* (40 %) extracts. In the study, several parameters were investigated including, teratogenic, toxic, mutagenic and genotoxic potential. The authors reported that all of the results were negative, indicating that CPV presents no toxicity and devoid of risk for human beings. We can hypothesize that the differences between the results of positive genotoxicity observed in our present *in vitro* study, and the studies of Tabach et al.(12) may be due to the fact that these authors used a mixture of three plant extracts, wherein the portion *C. oxyacantha* aerial parts extract (leaves, flowers and fruits) in the mixture, certainly was smaller and with different chemical composition, in comparison with the *C. oxyacantha* fruit extract tested in our study. This idea needs to be investigated in further studies.

The chemical characterization of *C. oxyacantha* fruit extract showed the presence of a significant content of flavonoids, being vitexin, isovitexin, hyperoside and vitexin-2-O-rhamnoside identified as major compounds. Some of these compounds had its toxicity evaluated singly. Choo et al. (33) conducted an *in vivo* acute toxicity test with the administration of vitexin and isovitexin in diabetic and normoglycemic animals. The authors reported that the rats did not show clear signs of toxicity during the study period, as well as no showed significant change in the weight.

Wenjuan-Wei et al.(34) studied the effects of vitexin-2-O-rhamnosideo and vitexin-4-O-glucoside on cell growth and induced apoptosis. This authors also reported no cytotoxic effects of these compounds in human cells derived from adipose tissue. According to our literature review, there is no studies evaluating the genetic toxicity of the major compounds found in *C. oxyacantha* fruit extract.

In general, the assessment of toxicity of different formulations with *Crataegus* extracts, in both, animals and humans, have shown low toxicity and low side effects (30). Nascimento et al. (26) tested the potential toxicity of the complex mix extracts of *Passiflora incarnata*, *Crataegus oxyacantha* and *Salix alba*. The study showed that the phytotherapeutic administered twice a day, during 28 days, did not produce toxicity in the organs and system of humans involved in the research. The evaluation was made by clinical, cardiological and laboratorial exams. Transient side effects including dizziness, gastrointestinal complaints, headaches and heart palpitations have been reported only occasionally (35).

Under the experimental conditions employed in the present study, the data obtained permit us to conclude that the fruit extract of *C. oxyacantha* present genotoxic and clastogenic/aneugenic effects in mononuclear leukocytes from human peripheral blood and HepG2 cells, as well as induced frameshift mutation in TA98 strain of *S. typhimurium* after metabolization by S9 liver enzymes. The effects observed lights on a red signal considering the safe use of this fruit extract in tradicional medicine. Despite the therapeutic potential of *C. oxyacantha* fruit extract for humans, our results recommend caution on its use, as well as indicate that further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to better investigate the genetic toxicity observed.

### **Acknowledgement**

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) (Grant: 2014/26882-2).

### **REFERENCES**

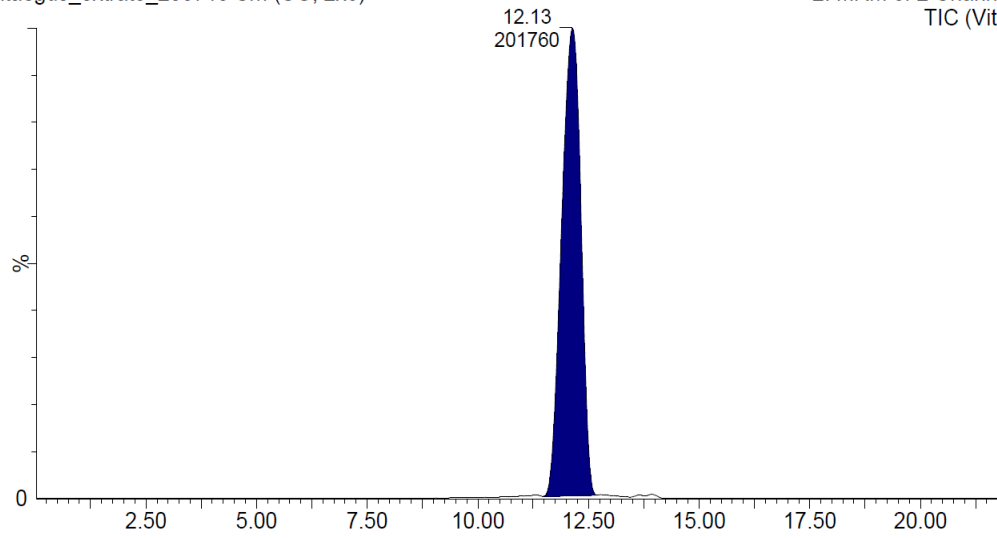
1. Weihmayr T, Ernst E. [Therapeutic effectiveness of *Crataegus*]. Fortschr Med. 1996;114(1-2):27-9.

2. Rigelsky JM, Sweet BV. Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses. *Am J Health Syst Pharm.* 2002;59(5):417-22.
3. Wang J, Xiong X, Feng B. Effect of crataegus usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:149363.
4. Chang WT, Dao J, Shao ZH. Hawthorn: potential roles in cardiovascular disease. *Am J Chin Med.* 2005;33(1):1-10.
5. Jayalakshmi R, Niranjali Devaraj S. Cardioprotective effect of tincture of *Crataegus* on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2004;56(7):921-6.
6. Hosseinimehr SJ, Mahmoudzadeh A, Azadbakht M, Akhlaghpour S. Radioprotective effects of Hawthorn against genotoxicity induced by gamma irradiation in human blood lymphocytes. *Radiat Environ Biophys.* 2009;48(1):95-8.
7. Hosseinimehr SJ, Azadbakht M, Mousavi SM, Mahmoudzadeh A, Akhlaghpour S. Radioprotective effects of hawthorn fruit extract against gamma irradiation in mouse bone marrow cells. *J Radiat Res.* 2007;48(1):63-8.
8. Hosseinimehr SJ, Azadbakht M, Tanha M, Mahmoodzadeh A, Mohammadifar S. Protective effect of hawthorn extract against genotoxicity induced by methyl methanesulfonate in human lymphocytes. *Toxicol Ind Health.* 2011;27(4):363-9.
9. Bahorun T, Aumjaud E, Ramphul H, Rycha M, Luximon-Ramma A, Trotin F, et al. Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. *Nahrung.* 2003;47(3):191-8.
10. W.N. C. genetic toxicology and cancer risk assesment. New York: Marcel Dekker, Inc; 2001.
11. Candido-Bacani Pde M, dos Reis MB, Serpeloni JM, Calvo TR, Vilegas W, Varanda EA, et al. Mutagenicity and genotoxicity of isatin in mammalian cells in vivo. *Mutat Res.* 2011;719(1-2):47-51.
12. Tabach R, Rodrigues E, Carlini EA. Preclinical toxicological assessment of a phytotherapeutic product--CPV (based on dry extracts of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L., and *Valeriana officinalis* L.). *Phytother Res.* 2009;23(1):33-40.
13. 487 OT. In vitro mammalian cell micronucleus test. OECD guideline for the testing of chemicals; 2014.
14. Panda A, Krishna SN, Dada T. Outcome of phacoemulsification in eyes with cataract and cornea opacity partially obscuring the pupillary area. *Nepal J Ophthalmol.* 2012;4(2):217-23.
15. Stopper H, Müller SO. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. *Toxicol In Vitro.* 1997;11(5):661-7.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
17. Riss TL. Cell viability assays. Bethesda: Assay guidance manual; 2013.
18. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-21.
19. Fenech M, Perrepetskaya G, Mikhalevich L. A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations--experiences from the Chernobyl catastrophe. *Environ Mol Mutagen.* 1997;30(2):112-8.
20. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995;339(1):37-59.
21. Hartmann A, Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett.* 1997;90(2-3):183-8.
22. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000;455(1-2):81-95.

23. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res.* 2006;600(1-2):58-66.
24. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983;113(3-4):173-215.
25. Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. *Mutat Res.* 1982;97(4):267-81.
26. Nascimento DF. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico contendo *Passiflora incarnata L.*, *Crataegus oxyacantha L.* e *Salix alba L.* em voluntários saudáveis. *Revista Brasileira de Farmacognesia*; 2009. p. 261.
27. Zhang Z, Chang Q, Zhu M, Huang Y, Ho WK, Chen Z. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. *J Nutr Biochem.* 2001;12(3):144-52.
28. Alp H, Soner BC, Baysal T, Şahin AS. Protective effects of Hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) extract against digoxin-induced arrhythmias in rats. *Anatol J Cardiol.* 2015;15(12):970-5.
29. Belščak-Cvitanović A, Durgo K, Bušić A, Franekić J, Komes D. Phytochemical attributes of four conventionally extracted medicinal plants and cytotoxic evaluation of their extracts on human laryngeal carcinoma (HEp2) cells. *J Med Food.* 2014;17(2):206-17.
30. Ammon HP, Händel M. [*Crataegus*, toxicology and pharmacology, Part I: Toxicity (author's transl)]. *Planta Med.* 1981;43(2):105-20.
31. Fenech M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. *Methods Mol Biol.* 2008;410:185-216.
32. Valentin-Severin I, Le Hegarat L, Lhuguenot JC, Le Bon AM, Chagnon MC. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat Res.* 2003;536(1-2):79-90.
33. Y. CC. Vitexin and isovitexin from the leaves of *Ficus deltoidea* with *in vivo*  $\alpha$ -glucosidade inhibition. 2012. p. 776-81.
34. Wei W, Ying X, Zhang W, Chen Y, Leng A, Jiang C, et al. Effects of vitexin-2"-O-rhamnoside and vitexin-4"-O-glucoside on growth and oxidative stress-induced cell apoptosis of human adipose-derived stem cells. *J Pharm Pharmacol.* 2014;66(7):988-97.
35. Daniele C, Mazzanti G, Pittler MH, Ernst E. Adverse-event profile of *Crataegus* spp.: a systematic review. *Drug Saf.* 2006;29(6):523-35.

## FIGURAS

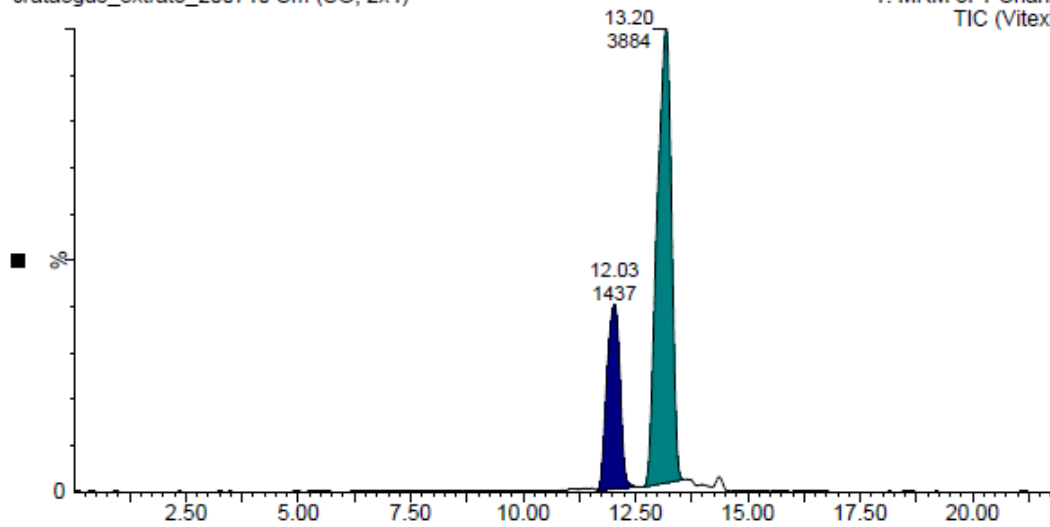
crataegus\_extrato\_200710 Sm (SG, 2x6)



2: MRM of 2 Channels ES-  
TIC (Vitexina 2)  
4.00e5  
Area

**Figura 1:** Cromatograma do extrato de frutos de *C. oxyacantha* identificando o composto vitexina-4-O-ramnosideo, m/z 577,31.

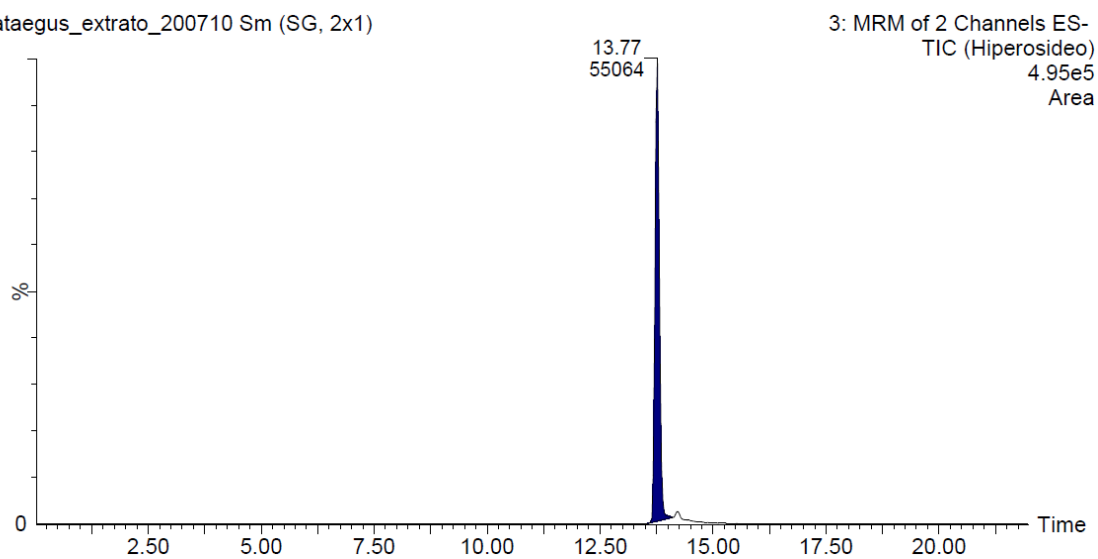
crataegus\_extrato\_200710 Sm (SG, 2x4)



1: MRM of 1 Channel ES-  
TIC (Vitexina/ Iso)  
1.08e4  
Area

**Figura 2:** Cromatograma do extrato de frutos de *C. oxyacantha* identificando os compostos vitexina e isovitexina, m/z 431,38.

crataegus\_extrato\_200710 Sm (SG, 2x1)



**Figura 3:** Cromatograma do extrato de frutos de *C. oxyacantha* evidenciando o composto hiperosideo, identificado na transição  $m/z$  46.1 >  $m/z$  300.2.

**TABELA 1.** Migração de DNA (média  $\pm$  DP) no ensaio cometa para estudo de genotoxicidade do extrato de frutos de *Crataegus oxyacantha* em células mononucleares de sangue periférico humano.

Tratamento	Classe dos cometas					Scores
	Total <sup>1</sup>	0	1	2	3	
Controle	7.50 $\pm$ 1.04	92.50 $\pm$ 1.04	6.83 $\pm$ 0.40	0.83 $\pm$ 0.98	0.00 $\pm$ 0.00	8.33 $\pm$ 2.33
2,5 $\mu$ g/mL	11.50 $\pm$ 2.51	88.50 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>	10.67 $\pm$ 2.94 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.75	0.00 $\pm$ 0.00	12.33 $\pm$ 2.25
5,0 $\mu$ g/mL	16.50 $\pm$ 2.07 <sup>c</sup>	83.50 $\pm$ 2.07 <sup>c</sup>	15.17 $\pm$ 1.47 <sup>c</sup>	1.16 $\pm$ 0.75	0.16 $\pm$ 0.40	17.50 $\pm$ 2.58 <sup>b</sup>
10 $\mu$ g/mL	42.33 $\pm$ 2.87 <sup>c</sup>	57.67 $\pm$ 2.87 <sup>c</sup>	13.83 $\pm$ 1.16 <sup>c</sup>	25.50 $\pm$ 1.64 <sup>c</sup>	3.00 $\pm$ 2.96 <sup>b</sup>	73.83 $\pm$ 7.44 <sup>c</sup>
50 $\mu$ g/mL	52.17 $\pm$ 2.40 <sup>c</sup>	47.83 $\pm$ 2.40 <sup>c</sup>	22.50 $\pm$ 2.81 <sup>c</sup>	26.50 $\pm$ 1.22 <sup>c</sup>	3.16 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	85.00 $\pm$ 2.96 <sup>c</sup>
100 $\mu$ g/mL	64.00 $\pm$ 6.81 <sup>c</sup>	32.67 $\pm$ 2.25 <sup>c</sup>	51.17 $\pm$ 1.72 <sup>c</sup>	14.00 $\pm$ 0.63 <sup>c</sup>	2.16 $\pm$ 0.98	85.67 $\pm$ 3.83 <sup>c</sup>
MMS 75 $\mu$ M (Controle Positivo)	64.17 $\pm$ 0.75 <sup>c</sup>	35.83 $\pm$ 0.75 <sup>c</sup>	51.50 $\pm$ 0.83 <sup>c</sup>	12.17 $\pm$ 0.75 <sup>c</sup>	0.83 $\pm$ 0.40	77.67 $\pm$ 1.03 <sup>c</sup>

DP = desvio padrão, <sup>a</sup> significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0.05$ ), <sup>b</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0.01$ ), <sup>c</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,001$ ), <sup>1</sup>Número total de células com danos (class 1+2+3).

**TABELA 2.** Migração de DNA (média  $\pm$  DP) no ensaio cometa para estudo de genotoxicidade do extrato de frutos de *Crataegus oxyacantha* em células Hep G2.

Tratamento	Classes de cometas					Scores
	Total <sup>1</sup>	0	1	2	3	
Controle	10.67 $\pm$ 0.57	89.33 $\pm$ 0.57	10.00 $\pm$ 1.00	0.66 $\pm$ 0.57	0.00 $\pm$ 0.00	11.33 $\pm$ 0.57
2,5 $\mu$ g/mL	12.67 $\pm$ 0.57	87.33 $\pm$ 0.57	11.33 $\pm$ 0.57	1.33 $\pm$ 0.57	0.00 $\pm$ 0.00	14.00 $\pm$ 1.00
5,0 $\mu$ g/mL	18.33 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	81.67 $\pm$ 0.57	17.67 $\pm$ 0.57	0.66 $\pm$ 0.57	0.00 $\pm$ 0.00	19.00 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>
10 $\mu$ g/mL	39.33 $\pm$ 1.15 <sup>b</sup>	60.67 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	13.33 $\pm$ 1.52	25.33 $\pm$ 1.52 <sup>b</sup>	0.66 $\pm$ 0.57	66.00 $\pm$ 2.64 <sup>b</sup>
50 $\mu$ g/mL	54.67 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	45.33 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	23.00 $\pm$ 2.00 <sup>b</sup>	28.33 $\pm$ 1.52 <sup>b</sup>	3.33 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	89.67 $\pm$ 1.52 <sup>b</sup>
100 $\mu$ g/mL	68.33 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	31.67 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	48.33 $\pm$ 1.15 <sup>b</sup>	16.33 $\pm$ 1.15 <sup>b</sup>	3.66 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	92.00 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>
MMS 75 $\mu$ M (Controle Positivo)	65.00 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>	35.00 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>	52.33 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	11.67 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	78.67 $\pm$ 1.52 <sup>b</sup>

DP = desvio padrão, <sup>a</sup> significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0.05$ ), <sup>b</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0.01$ ), <sup>1</sup>Número total de células com danos (class 1+2+3).

**TABELA 3.** Frequência de micronúcleos e índice de divisão nuclear (IDN) em linfócitos humanos tratados com *Crataegus oxyacantha*.

Substância teste	Tratamento		Células binucleadas Com MN (2,000 cells scored)		IDN/1000cell  (Média ± DP)
	Período (h)	Concentrações (µg/mL)	Nº	%	
Controle negativo	28	0	6	0.30	1.75 ± 0.03
MMS (Controle positivo)	28	150*	97 <sup>b</sup>	4.85 <sup>b</sup>	1.64 ± 0.04 <sup>b</sup>
<i>Crataegus oxyacantha</i>	28	2.5	11	0.55	1.66 ± 0.01
	28	5.0	10	0.50	1.72 ± 0.03
	28	10	14 <sup>a</sup>	0.70 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.01 <sup>a</sup>
	28	50	16 <sup>a</sup>	0.80 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.02 <sup>a</sup>
	28	100	16 <sup>a</sup>	0.80 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.06 <sup>a</sup>

MN = micronúcleos, DP = desvio padrão, \* concentração em µM, <sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo (p < 0.01), <sup>b</sup> Significativamente diferente do controle negativo (p < 0.001).

**TABELA 4.** Frequência de micronucleos e índice de divisão nuclear (IDN) em células HepG2 tratadas com *Crataegus oxyacantha*

Substância teste	Tratamento		Células Binucleadas com MN (3,000 cells scored)		IDN/1500cell  (Mean ± SD)
	Período (h)	Concentração (µg/mL)	Nº	%	
Controle negative	24	0	13	0.43	1.60±0.005
Benzo[a]Pirene (Controle positivo)	24	150*	146	4.86 <sup>b</sup>	1.62±0.005
<i>Crataegus oxyacantha</i>	24	2.5	11	0.36	1.64±0.010 <sup>b</sup>
	24	5.0	14	0.46	1.62±0.011 <sup>b</sup>
	24	10	21	0.70 <sup>a</sup>	1.61±0.005
	24	50	23	0.76 <sup>b</sup>	1.64±0.005 <sup>b</sup>
	24	100	26	0.86 <sup>b</sup>	1.61±0.005

MN = micronúcleos, DP = desvio padrão, \* concentração em µM, <sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo (p < 0.01), <sup>b</sup> Significativamente diferente do controle negativo (p < 0.001).

**TABELA 5** - Mutagenicidade do extrato de frutos de *Crataegus oxyacantha* em *Salmonella typhimurium* na presença (+S9) e ausência (-S9) de fração metabolizadora.

Tratamentos ( $\mu\text{g/mL}$ )	Número de revertentes ( $M \pm DP$ )/ placa			
	TA 98		TA 100	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9
<b>0<sup>1</sup></b>	23,00 $\pm$ 3,94	22,00 $\pm$ 2,00	100,20 $\pm$ 9,88	110,50 $\pm$ 17,20
<b>2,5</b>	28,00 $\pm$ 1,41	1810,67 $\pm$ 327,96**	102,33 $\pm$ 3,06	104,67 $\pm$ 12,01
<b>5,0</b>	26,67 $\pm$ 6,43	3238,00 $\pm$ 557,20**	108,67 $\pm$ 17,67	107,00 $\pm$ 3,00
<b>10,0</b>	28,33 $\pm$ 2,08	584,50 $\pm$ 188,80*	98,33 $\pm$ 13,01	105,67 $\pm$ 10,50
<b>100,0</b>	24,33 $\pm$ 5,03	1801,00 $\pm$ 74,95**	119,00 $\pm$ 4,36	99,00 $\pm$ 11,79
<b>250,0</b>	27,00 $\pm$ 2,65	3574,00 $\pm$ 183,85**	104,00 $\pm$ 4,00	107,67 $\pm$ 8,33
<b>500,0</b>	25,00 $\pm$ 5,20	3402,67 $\pm$ 165,71**	116,00 $\pm$ 11,27	107,00 $\pm$ 3,61

<sup>1</sup>Controle negativo, \* Significativamente diferente do controle negativo por ANOVA ( $p < 0,05$ ), \*\* Significativamente diferente do controle negativo por ANOVA ( $p < 0,01$ )

## 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho representa o primeiro estudo de avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do extrato exclusivo de frutos de *Crataegus oxyacantha*. Os dados obtidos mostraram que o referido extrato apresenta efeito genotóxico em células mononucleares do sangue periférico humano e células HepG2 em cultura, detectado por intermédio do ensaio cometa. Pelo teste citogenético do micronúcleo, também pôde-se observar efeito clastogênico/aneugênico nos dois tipos de células humanas investigados. E, por fim, complementando as análises de toxicidade genética, o teste de Ames evidenciou que o extrato, após metabolização, produziu mutações gênicas na linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium*. Considerando a comprovada relação entre as mutações e o processo carcinogênico, os importantes resultados obtidos no presente trabalho indicam que, apesar do potencial terapêutico do extrato de frutos de *C. oxyacantha* para os seres humanos, o seu uso contínuo e/ou doses altas devem ser vistos com muita cautela ou até mesmo temporariamente suspensos, bem como apontam para a necessidade de serem realizados mais estudos de toxicidade genética, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”, avaliando também extratos de folhas e flores desta planta, uma vez que análises com este enfoque praticamente não foram encontrados em nossa revisão da literatura.



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

