

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/01/2017.

**“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*

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS 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

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

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

Cm² - 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

MNStB - 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

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

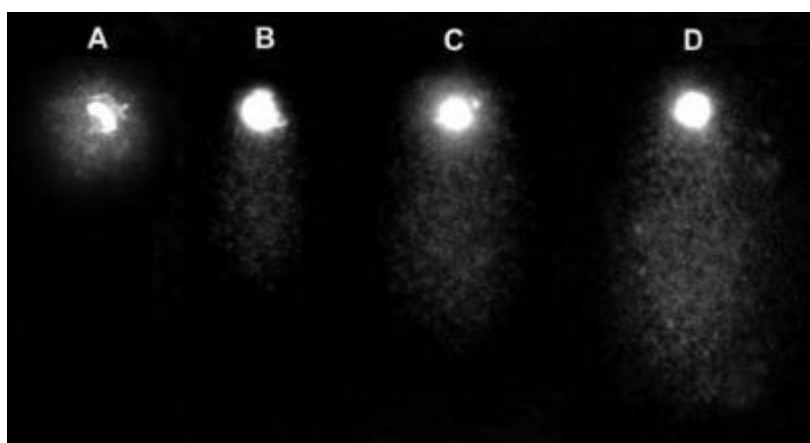


Figura 1: Classes observadas de cometas: A classe 0, B classe 1, C classe 2 e D classe 3 (CORTÉS-GUTIÉRREZ *et al.*, 2011).

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.

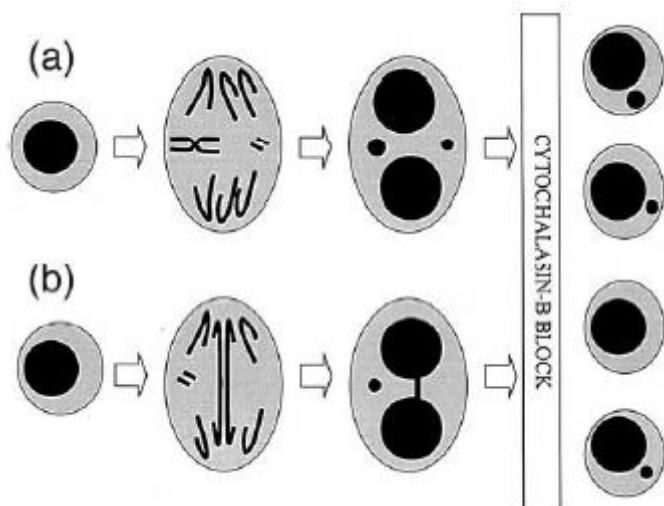


Figura 2: Formação de micronúcleos e representação com citocalasina B (FENECH, 2000).

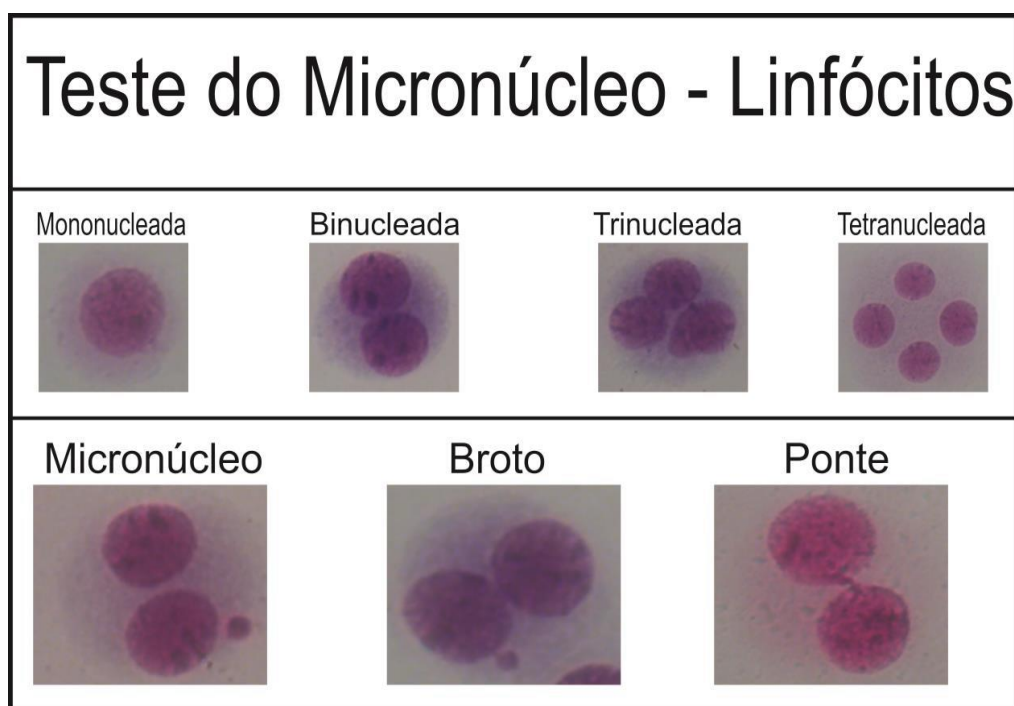


Figura 3. Teste do Micronúcleo em linfócitos humanos, com os parâmetros que são avaliados (FRODER, 2016).

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, CYP2B E CYP2E1, 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.

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

WEIHMAYR, 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