

**ALINE MIRANDA PRIETO**

**Avaliação de Reparo de DNA e Atividade  
Antioxidante do Extrato Etanólico e Substâncias  
Isoladas de *Casearia sylvestris***

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

**Orientadora: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares**

**Coorientadora: Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda**

**Coorientadora: Profa. Dra. Valéria Valente**

Araraquara - SP

2012

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

P494a Prieto, Aline Miranda  
Avaliação de Reparo de DNA e Atividade Antioxidante do Extrato  
Etanólico e Substâncias Isoladas de *Casearia sylvestris* / Aline Miranda  
Prieto. – Araraquara, 2012  
155 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita  
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação  
em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia  
Orientador: Christiane Pienna Soares  
Coorientador: Eliana Aparecida Varanda  
Coorientador: Valéria Valente

1. *Casearia sylvestris*. 2. Casearinas. 3. Cometa. 4. Reparo de DNA. 5.  
Antioxidante. I. Soares, Christiane Pienna, orient. II. Varanda, Eliana  
Aparecida, coorient. III. Valente, Valéria, coorient. IV. Título.

**CAPES: 40300005**

*Dedico este trabalho à minha mãe Adelina (in memoriam), ao meu irmão Vítor e ao meu marido Raphael por toda força e apoio que sempre me deram em momentos importantes da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À essa grande energia que nos rege, qualquer que seja o nome que a ela seja atribuído, pela proteção e direção.*

*À minha mãe Adelina, que mesmo tendo ficado pouco tempo comigo, ficou tempo suficiente para me passar ótimos princípios, ser meu maior exemplo de força e caráter. E, que certamente, mesmo sem querer, plantou a sementinha da ciência em mim.*

*Ao meu irmão Vítor por ser um grande amigo, pelas conversas e por ser um companheiro de todas as horas. Especificamente, muito obrigada por desde minha iniciação científica, ir me visitar em Araraquara nos feriados e, ainda, me ajudar com as gaiolas dos camundongos. Mais recentemente, pelas valiosas discussões e ajudas científicas que tivemos até o fim do meu doutorado.*

*Ao meu avô, Álvaro, um homem que sempre valorizou o conhecimento e que foi o maior incentivador para que eu cursasse Farmácia-Bioquímica.*

*À tia Rosalina, por me apresentar o maravilhoso mundo da leitura, o que diretamente aumentou meu gosto pelo aprendizado. E que hoje, me dá a honra de ter esta tese gramaticalmente e ortograficamente revisada por ela.*

*À minha amiga Fabiane, que apesar de nos vermos pouco, quando nos encontramos parece que sempre estivemos juntas como quando eramos criança.*

*Ao meu tio Homero pela companhia, carinho e preocupação de sempre, pelos conselhos, pela torcida e por sempre ajudar.*

*Aos meus primos queridos Homero, Natalia, Carol, Gabi e Duda pelos bons momentos.*

*À tia Con pelo apoio nos momentos de dificuldade, pela amizade que me trouxe muitas alegrias e pelos conselhos extremamente valiosos.*

*À Dri e ao Ivair pela torcida e carinho.*

*Ao meu marido Raphael por sempre entender minha ausência quando eu estava trabalhando nos horários não usuais que a carreira acadêmica acaba nos impondo, pelo apoio incondicional, por andar sempre ao meu lado, por ser a melhor companhia que eu poderia ter escolhido para o resto da minha vida e pela grande ajuda que me deu ao longo do meu doutorado.*

*À professora Christiane Pienna Soares do laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular (UNESP) por ter me incentivado a seguir essa trilha desde a iniciação científica, pela paciência e por ser um grande exemplo de persistência e superação.*

*Aos meus amigos da República Monte Púbis: Raquel, Thaty, Mari, Fabrício, Ju, Marina, Dani e Pollyana por tornarem aquela casa o meu ponto de apoio, pela alegria e companhia durante a faculdade.*

*Aos meus amigos de faculdade: Adriana, Aline, Ana Carolina, Debora, Eduardo e Anderson pelos maravilhosos momentos que passamos juntos.*

*À professora Eliana Varanda do laboratório de mutagênese (UNESP) pela amizade, apoio e por estar sempre de portas abertas e com um sorriso no rosto quando precisei de ajuda e orientação.*

*À professora Valéria Valente do laboratório de Biologia Celular (UNESP) pelas sugestões e colaboração.*

*Ao pessoal do Laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular, em especial às ex-ICs Camila Caliri e Fernanda Gargantini e ao IC Flávio Monteiro pela amizade e por me ensinarem muito mais do que eu ensinei a vocês. Ao Felipe por estar pronto a ajudar a qualquer momento, ao Luís, Rodolfo, Tarsia, Thais, Ju Ferreira, Belzinha e Cafundó pelos bons momentos. À Bel e ao Marcos pelo excelente apoio técnico.*

*À técnica do laboratório de microbiologia Silvia Helena David tanto pelo apoio técnico como pelas ótimas conversas e conselhos.*

*Às meninas “EVs” do laboratório de mutagênese (UNESP): Flávia e Mari pelos ótimos momentos.*

*Aos colaboradores científicos professor André Gonzaga (UNESP) e professora Raquel Alves (UNIFRAN) que foram meus irmãos mais velhos da ciência e que me guiaram em momentos importantes da minha carreira. Também agradeço aos professores da UNESP: Alberto Cavalheiro, Dulce Helena e Vanderlan Bolzani pela colaboração de tantos anos.*

*Aos vizinhos dos laboratórios de Bioquímica Clínica, Micologia Clínica e Imunologia Clínica, por compartilharem algumas vezes parte de sua estrutura para que este projeto fosse realizado.*

*Aos funcionários da FCFar-UNESP que colaboraram com seu excelente trabalho direta ou indiretamente para que este projeto pudesse acontecer. Em especial às secretárias Eliana do*

*departamento de Análises Clínicas e Margareth do departamento de Ciências Biológicas. Também ao pessoal da seção de pós-graduação pela eficiência, especialmente à Claudinha.*

*Ao professor Carlos Menck (USP) por nos ter recebido de portas abertas e, em uma conversa de 30 minutos e um rascunho em um pequeno pedaço de papel, ter ajudado a dar início à elaboração do projeto deste trabalho de doutorado. Pelo exemplo de profissionalismo e humildade que ele me deu enquanto estive em seu laboratório. Aos seus alunos: André, Teiti, Vítor, Juliana, Debora, Carolina e Letícia pela colaboração e amizade.*

*Ao professor Silvio De Flora (Universidade de Estudos de Genova, Itália) por ter me recebido de portas abertas em seu laboratório, onde tive a oportunidade de grande aprendizado. Ao pessoal da sua equipe: professor Alberto Izzotti, professor Francesco D'Agostini, aos pesquisadores Sebastiano, Rosanna, Grazia, Cristina e Alessandra e aos técnicos Anna e Carlo por todo apoio e amizade durante o período maravilhoso que passei em Genova.*

*À Marcia Pancheri, professora de Italiano, pela amizade, ajuda com o aprendizado da língua e orientação nos trâmites da viagem.*

*À vó Carmen pelos ótimos conselhos, pelas orações e pela torcida de sempre.*

*Às minhas gatinhas Camila, Chiara e Michele que foram ótimas companhias durante todo esse tempo e só me dão alegria.*

*À FCFar UNESP pelo acolhimento e estrutura proporcionada desde minha graduação.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa de doutorado (2008/58908-0) e pelo auxílio à pesquisa regular (2009/52481-7).*

*À Fundação para o Desenvolvimento da UNESP - Fundunesp pelo auxílio à pesquisa regular (00797-DFP)*

*À Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche – PDSE - (5255-11-2)*

*“A vida me ensinou a nunca desistir. Nem ganhar, nem perder, mas procurar evoluir.”*

*Alexandre Magno Abrão*

## RESUMO

Trabalhos demonstraram que derivados da planta *Casearia sylvestris* protegem o DNA de danos. Dessa forma, este trabalho visa avaliar por quais mecanismos essa proteção ocorre. Os produtos naturais avaliados foram o extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* e os diterpenos clerodânicos obtidos deste extrato: casearinas B, D e X e caseargrewiina F. Para a avaliação dos efeitos propostos foram utilizadas como modelo as linhagens celulares HepG2, MRC5, XP4PA e Hepa 1c1c7. Primeiramente, os produtos naturais foram avaliados com relação à sua atividade citotóxica pelo teste do MTT e ensaio de sobrevivência clonogênica nos tempos de 24 e 48 h, obtendo-se o IC<sub>50</sub> e o IC<sub>20</sub>. Em seguida, foi realizado o ensaio de genotoxicidade do cometa no tempo de 24 h utilizando-se incubação com a enzima FPG nas linhagens HepG2, MRC5 e XP4PA. Os produtos naturais se mostraram genotóxicos mesmo em pequenas concentrações. Após este ensaio, foi avaliada a antigenotoxicidade dos produtos naturais já nas concentrações pouco genotóxicas e não citotóxicas por 24 h. Para tanto, as células HepG2 foram expostas ao mutágeno peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 1mM) e pré e pós-tratadas com os produtos naturais. E, as linhagens MRC5 e XP4PA foram expostas à radiação ultravioleta C (UVC) e pré e pós-tratadas com os produtos naturais. Para a linhagem HepG2, o extrato etanólico, as casearinas B e D apresentaram inibição de danos fortes nas maiores concentrações testadas. Já para a linhagem MRC5 somente a casearina B foi capaz de produzir inibição moderada na concentração de 0,04 µM. Adicionalmente, foi verificada a resposta antiapoptótica dos produtos naturais pelo método da anexina-V-FITC/PI nas linhagens submetidas aos mesmos mutágenos do ensaio do cometa, aplicando-se o protocolo de pós-tratamento com os produtos naturais. Os diterpenos clerodânicos aumentaram porcentagem de células vivas e diminuíram a porcentagem de células apoptóticas nas maiores concentrações para a linhagens HepG2. Na linhagem MRC5, foi possível observar o mesmo efeito antiapoptótico somente para a casearina B (0,04 µM). Já para a linhagem XP4PA não foi observada alteração no perfil de morte celular. Ainda, foi avaliada a atividade antioxidante *ex-vivo* através de ensaio com DCFDA (diacetato de diclorfluoresceína) em células HepG2 previamente tratadas com os produtos naturais e em seguida, expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM). O extrato etanólico as casearinas B e X e a caseargrewiina F reduziram significativamente a quantidade de ROS (espécies reativas de oxigênio) quando comparados com o controle de veículo, entretanto, não foram tão potentes quanto a quercetina, um antioxidante derivado de produto natural. Dentre os produtos naturais, aquele que foi mais eficaz no ensaio de atividade antioxidante foi a casearina B. Adicionalmente, foi realizado o ensaio de indução da enzima quinona redutase na linhagem Hepa 1c1c7. Nenhum dos produtos naturais se mostrou capaz de induzir a quinona redutase em níveis significantes. Pode-se concluir que os produtos naturais apesar de exibirem característica genotóxica, também são capazes de auxiliar na remoção de danos ao DNA, e em baixas concentrações foram capazes de reduzir os níveis de ROS gerados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

Studies have shown that *Casearia sylvestris* derivatives protect DNA from damage. Thus, the aim of this study was to evaluate the mechanisms through which this protection occurs. The samples used in this study were the ethanolic extract of *C. sylvestris* leaves and the clerodane diterpenes obtained from this extract, including casearins B, D and X, and caseargrewiin F. The following cell lines were used: HepG2, MRC5, XP4PA and Hepa 1c1c7. First, all samples were assessed for their cytotoxic activity by using both the MTT assay and the clonogenic survival assay after 24 and 48 h of exposure, yielding the IC<sub>50</sub> and IC<sub>20</sub>. Afterwards, the genotoxicity of the samples was assessed within 24 h following incubation with the samples using the FPG enzyme in the cell lines HepG2, MRC5 and XP4PA. The compounds proved to be genotoxic at all concentrations tested. Subsequently, the antigenotoxicity of the samples was assessed at concentrations that were at very low levels of cytotoxic or genotoxic after 24 h. HepG2 cells were exposed to the mutagen hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mM) and either pre or post-treated with the samples. Additionally, the cell lines MRC5 and XP4PA were exposed to ultraviolet C (UVC) and either pre or post-treated with the compounds. For the ethanolic extract in the HepG2 cell line, the casearins B and D showed strong inhibition of damage at the highest concentrations tested. In the MRC5 cell line, only casearin B was able to produce moderate inhibition (at 0.04 mM). Additionally, the anti-apoptotic response of the samples was assessed by an annexinV-FITC/PI assay in cell lines that were exposed to the same mutagens used in the comet assay, followed by post-treatment with the samples. The clerodane diterpenes, at high concentrations, increased the percentage of live cells and decreased the percentage of apoptotic cells in HepG2 cells. In MRC5 cells, it was possible to observe the same anti-apoptotic effect only for casearin B (0.04 mM). In XP4PA cells, no change was observed in the cell death profile. In addition, antioxidant activity was assessed by using DCFDA (dichlorofluorescein diacetate) in HepG2 cells pre-treated with the samples and then exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM). The ethanolic extract, the casearins B and X, and caseargrewiin F significantly reduced the amount of ROS when compared with the vehicle control; however, none of the samples were as potent as quercetin, an antioxidant derived from natural products. Among the samples, the one that was the most effective as an antioxidant was casearin B. Additionally, the induction of the quinone reductase enzyme in the Hepa 1c1c7 cell line was assessed; however, none of the samples significantly induced quinone reductase levels. It can be concluded that, although the samples are genotoxic, they are also able to assist in the removal of DNA damage, and, at low concentrations, they are capable of reducing ROS levels produced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1: <i>Casearia sylvestris</i> .....	20
Figura 2: Fórmula estrutural dos diterpenos clerodânicos obtidos do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> utilizados neste trabalho .....	22
Figura 3: Exemplos de modificações oxidativas encontradas nas bases nitrogenadas de DNA de mamíferos .....	26
Figura 4: Fotolesões encontradas no DNA após irradiação com UV .....	30
Figura 5: Algumas proteínas envolvidas na via de NER.....	32
Figura 6: Classificação dos tipos celulares presentes no ensaio de apoptose por anexina-V-FITC/PI .....	45
Figura 7: Genotoxicidade dos produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> pelo ensaio do cometa .....	52
Figura 8: Antigenotoxicidade dos produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> em células HepG2.....	54
Figura 9: Antigenotoxicidade dos produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> em células MRC5 sem incubação com S956 .....	56
Figura 10: Antigenotoxicidade dos produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> em células MRC5 com incubação com S957 .....	57
Figura 11: Antigenotoxicidade dos produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> em células XP4PA sem incubação com S958 .....	58
Figura 12: Antigenotoxicidade dos produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> em células XP4PA com incubação com S959 .....	59
Figura 13: Imagem ilustrativa dos nucleóides obtidos no ensaio do cometa e de sua análise pelo programa Tritex CometScore® .....	60
Figura 14: Ensaio de apoptose pelo método da anexina-V – Iodeto de Propídeo em células HepG2 expostas ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1mM) e pós tratadas 24h com os produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> .....	61
Figura 15: Ensaio de apoptose pelo método da anexina-V – Iodeto de Propídeo em células MRC5 expostas ao UVC (26,5 J/m <sup>2</sup> ) e pós tratadas com os produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> .....	62
Figura 16: Ensaio de apoptose pelo método da anexina-V – Iodeto de Propídeo em células XP4PA expostas ao UVC (3,59 J/m <sup>2</sup> ) e pós tratadas com os produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> .....	63
Figura 17: Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com o extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> frente às ROS geradas pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1mM) utilizando-se o fluoróforo DCFDA.....	64
Figura 18: Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com a casearina B frente às ROS geradas pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1mM) utilizando-se o fluoróforo DCFDA .....	65
Figura 19: Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com a casearina D frente às ROS geradas pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1mM) utilizando-se o fluoróforo DCFDA .....	66
Figura 20: Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com a caseargrewiina F frente às ROS geradas pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1mM) utilizando-se o fluoróforo DCFDA .....	67
Figura 21: Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com a casearina X frente às ROS geradas pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1mM) utilizando-se o fluoróforo DCFDA .....	68

## Capítulo 2

Figura 1: Epidemiologia do câncer de pulmão com relação ao consumo de cigarros nos EUA de 1900 a 2000.....	98
Figura 2: Fórmula estrutural das substâncias utilizadas neste estudo.....	100
Figura 3: Sistema de exposição ao fumo Teague Enterprises .....	104
Figura 4: Níveis de adutos de DNA no pulmão de camundongos adultos Swiss ICR(CD-1 <sup>®</sup> ) expostos desde o nascimento à fumaça de cigarro em variáveis concentrações de PT por 28 dias .....	113
Figura 5: Dano oxidativo avaliado em termos de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo), no pulmão de camundongos Swiss ICR(CD-1 <sup>®</sup> ) expostos desde o nascimento a diferentes concentrações de PT por 28 dias.....	114
Figura 6: Ensaio de MTT para os produtos naturais testados nos ensaios de quimioprevenção frente ao CS em células H727.....	115
Figura 7: Resposta de viabilidade dos quimiopreventivos sem e com associação às nanopartículas em células H727 através do ensaio de MTT .....	116
Figura 8: Ensaio do cometa para avaliação da resposta ao dano de DNA de NAC sozinho e associado às nanopartículas em células H727.....	117
Figura 9: Ensaio do cometa para avaliação da resposta ao dano de DNA de PEITC sozinho e associado às nanopartículas em células H727.....	118
Figura 10: Ensaio do cometa para avaliação da resposta ao dano de DNA de Resveratrol sozinho e associado às nanopartículas em células H727 .....	119
Figura 11: Nucleóides obtidos no ensaio de genotoxicidade .....	120
Figura 12: Ensaio de morte celular com NAC em células H727.....	120
Figura 13: Ensaio de morte celular com PEITC em células H727.....	121
Figura 14: Ensaio de morte celular com Resveratrol em células H727 .....	122
Figura 15: Análise da expressão relativa de DICER frente ao GAPDH, realizando-se o silenciamento do gene e tratamento com CS.....	123

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1: Comparação entre as concentrações inibitórias obtidas no tempo de 24 h para os produtos naturais derivados de *C. sylvestris* nas linhagens HepG2, MRC5 e XP4PA.....49

Tabela 2: Comparação entre as concentrações inibitórias obtidas no tempo de 48 h para os produtos naturais derivados de *C. sylvestris* nas linhagens HepG2, MRC5 e XP4PA.....50

Tabela 3: Ensaio de indução da enzima quinona redutase em células Hepa 1c1c7 tratadas com os produtos naturais de *C. sylvestris* por 48 h.....69

### Capítulo 2

Tabela 1: Concentração de particulado total administrado aos diferentes grupos de camundongos .....113

Tabela 2: Qualidade dos RNAs extraídos para o ensaio de silenciamento de DICER e resposta frente ao CS em células H727.....123

## ABREVIACÕES UTILIZADAS

$\lambda$  - comprimento de onda

$\alpha$ -MEM – meio mínimo essencial de Eagle modificação alfa

$\mu$ Ci – micro Curie

6-4 PPs - (6,4) fotoprodutos

7-AD - 7-amino-actinomicina D

8-oxo-dGuo - 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

ANOVA – análise de variância

AP - sítios apurínicos ou apirimidínicos

ARE - elemento de resposta antioxidante

B – casearina B

BER – reparo de DNA por excisão de bases

cDNA – DNA complementar

CN – controle negativo

CPD - dímero de pirimidina ciclobutano ou dímero de ciclobutano dipirimidina

cpm - contagens por minuto

CS - condensado de fumaça de cigarro

CV – controle de veículo

cv – cristal violeta

D – casearina D

DCFDA - diacetato de diclorfluoresceína

DMEM – meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

E – extrato etanólico de *C. sylvestris*

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EFS - extração em fase sólida

EP – erro padrão

F – caseargrewiina F

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FPG - DNA glicosilase formamidopirimidina

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GGR – reparo de DNA global do genoma

IC<sub>20</sub> - concentração inibitória de 20 %

IC<sub>50</sub> - concentração inibitória de 50 %

IR – índice de redução

J - joules

Keap1 - Kelch-*like* proteína associada à ECH

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato básico de potássio

miRNAs – micro RNAs

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

NAC - N-acetilcisteína

NADP – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenada

NER - reparo de DNA por excisão de nucleotídeos

Nrf2 – Fator nuclear relacionado à E2 fator 2

OptiMEM - meio reduzido de soro – modificação do meio mínimo essencial de Eagle

PBS - *phosphate buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PCR – reação em cadeia da polimerase

PEITC - Feniletil-isotiocianato

pH - potencial hidrogeniônico

PI – iodeto de propídeo

PT - particulado

Q – quercetina

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

QR – quinona redutase

RAD23B – proteína do reparo de excisão de DNA homóloga B

RES - Resveratrol

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigênio

RPMI – meio do instituto e memorial Roswell Park

SC – sobrevivência clonogênica

siRNA – pequeno RNA de interferência

TCR – reparo de DNA acoplado à transcrição

TFIIH – fator de transcrição II H

TLC - cromatografia em camada fina multidirecional

U – unidades

UV – ultravioleta

UVA – ultravioleta A

UVB – ultravioleta B

UVC - ultravioleta C

V – volts

v – volume

X – casearina X

x g – número de vezes do valor da gravidade

XP - *Xeroderma pigmentosum*

XPC – proteína de *Xeroderma pigmentosum* deficiente no grupo de complementação C

XPE – proteína de *Xeroderma pigmentosum* deficiente no grupo de complementação E

## SUMÁRIO

Capítulo 1.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. <i>Casearia sylvestris</i> .....	20
1.1.2. Diterpenos clerodânicos de <i>C. sylvestris</i> .....	21
1.1.3. Produtos naturais extraídos de <i>C. sylvestris</i> e seus efeitos no DNA .....	23
1.2. Mecanismos de antimutagênese .....	24
1.3. Agentes causadores de danos ao DNA e mecanismos de redução ou remoção desses danos .....	24
1.3.1. Dano oxidativo ao DNA .....	25
1.3.2. Produtos naturais e enzimas com atividade antioxidante .....	27
1.3.3. Combate às lesões oxidativas no DNA .....	28
1.3.4. Danos no DNA provocados por radiação UV.....	29
1.3.5. Reparo de lesões ocasionadas por UV - Reparo por excisão de nucleotídeos (NER).....	30
1.4. Apoptose e reparo de DNA.....	32
1.5. Ativação da enzima quinona redutase .....	33
2. OBJETIVO GERAL.....	33
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1. Obtenção do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> .....	34
3.2. Obtenção dos diterpenos clerodânicos de <i>C. sylvestris</i> .....	35
3.3. Solubilização dos produtos naturais.....	35
3.4. Cultura de células .....	36
3.5. Avaliação da citotoxicidade .....	37
3.5.1. Ensaio do MTT .....	37
3.5.2. Ensaio de sobrevivência clonogênica .....	38
3.6. Ensaio do cometa .....	39
3.6.1. Cálculo da concentração do peróxido de hidrogênio.....	40
3.6.2. Atividade genotóxica dos produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> .....	41
3.6.3. Atividade antigenotóxica dos produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> .....	42
3.7. Ensaio de morte celular – Anexina-V-FITC/PI.....	43
3.8. Análise da atividade antioxidante em células HepG2 utilizando DCFDA .....	45
3.9. Análise da indução da enzima quinona redutase.....	46
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
5. RESULTADOS.....	48

5.1. Avaliação da citotoxicidade pelos ensaios de MTT e sobrevivência clonogênica .....	48
5.2. Ensaio de genotoxicidade dos produtos naturais de <i>C. sylvestris</i> .....	50
5.3. Ensaio de antigenotoxicidade dos produtos naturais extraídos de <i>C. sylvestris</i> .....	53
5.4. Ensaio de morte celular - Anexina-V-FITC/PI.....	60
5.5. Atividade antioxidante em células HepG2 utilizando DCFDA .....	64
5.6. Ensaio de quinona redutase .....	69
6. DISCUSSÃO .....	70
7. CONCLUSÕES .....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80
Capítulo 2.....	95
ESTÁGIO DE DOUTORADO NO EXTERIOR.....	96
APLICAÇÃO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DE QUIMIOPREVENÇÃO <i>in vivo</i> E <i>ex vivo</i> CONTRA MUTÁGENOS DA FUMAÇA DE CIGARRO .....	96
1. INTRODUÇÃO.....	98
1.1. Câncer de pulmão e o fumo de derivados do tabaco.....	98
1.2. Mecanismos de quimioprevenção .....	99
1.3. Quimiopreventivos quimiopreventivos.....	100
1.4. Nanopartículas.....	101
1.5. O papel do gene DICER no processamento de miRNAs .....	101
2. OBJETIVO GERAL.....	102
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	102
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	103
3.1. Avaliação de biomarcadores intermediários em tecidos de pulmão de camundongos Swiss ICR (CD-1®) expostos à fumaça de cigarro.....	103
3.1.1. Exposição dos camundongos à fumaça de cigarro.....	103
3.1.2. Tratamentos .....	103
3.1.3. Detecção dos adutos de DNA .....	104
3.1.4. Análise da 8-Hidroxi-2'-Deoxiguanosina em células de pulmão de camundongos.....	105
3.2. Quimioprevenção dos danos causados pelo condensado da fumaça de cigarro em células H727 utilizando nanopartículas .....	106
3.2.1. Substâncias .....	106
3.2.2. Nanopartículas lipossômicas catiônicas .....	107
3.2.3. Cultura de células .....	107
3.2.4. Protocolo de quimioprevenção .....	108
3.2.5. Ensaio de MTT .....	108

3.2.6. Ensaio do cometa .....	109
3.2.7. Ensaio de morte celular – Anexina-V-APC/7-AD .....	110
3.3. Regulação da expressão do gene de DICER por CS em células H727 .....	111
3.3.1. Silenciamento de DICER .....	111
3.3.2. PCR em tempo real (qPCR) .....	112
4. RESULTADOS.....	113
4.1. Avaliação de biomarcadores intermediários em tecidos de pulmão de camundongos Swiss ICR (CD-1 <sup>®</sup> ) expostos à fumaça de cigarro.....	113
4.1.1. Quantificação de particulado total (PT) nos diferentes grupos de camundongos.....	113
4.1.2. Detecção de adutos de DNA em pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro.....	113
4.1.3. Análise da 8-Hidroxi-2'-Deoxiguanosina em células de pulmão de camundongos.....	114
4.2. Quimioprevenção dos danos causados pelo condensado da fumaça de cigarro em células H727 utilizando nanopartículas .....	115
4.2.1. Ensaio de MTT para determinação do IC <sub>20</sub> dos quimiopreventivos usados no teste de quimioprevenção em células H727. ....	115
4.2.2. Ensaio de MTT para comparação da resposta de viabilidade dos quimiopreventivos não associados e associados às nanopartículas. ....	116
4.2.3. Ensaio do cometa de genotoxicidade e antigenotoxicidade frente ao CS com os quimiopreventivos NAC, PEITC e Resveratrol em células H727. ....	117
4.2.3.1. Ensaios de genotoxicidade e antigenotoxicidade com o quimiopreventivo NAC.....	117
4.2.3.2. Ensaios de genotoxicidade e antigenotoxicidade com o quimiopreventivo PEITC.....	118
4.2.3.3. Ensaios de genotoxicidade e antigenotoxicidade com o quimiopreventivo Resveratrol .....	119
4.2.4. Ensaio de morte celular – AnexinaV/7-AD para avaliação comparativa dos efeitos dos quimiopreventivos em células H727. ....	120
4.2.4.1. Ensaio de morte celular para o quimiopreventivo NAC.....	120
4.2.4.2. Ensaio de morte celular para o quimiopreventivo PEITC.....	121
4.2.4.3. Ensaio de morte celular para o quimiopreventivo Resveratrol .....	122
4.3. Avaliação do efeito da expressão de DICER frente ao CS em células H727 previamente silenciadas para este gene. ....	123
5. DISCUSSÃO .....	124
5.1. Avaliação de biomarcadores intermediários em tecidos de pulmão de camundongos Swiss ICR (CD-1 <sup>®</sup> ) expostos à fumaça de cigarro.....	124
5.2. Quimioprevenção dos danos causados pelo condensado da fumaça de cigarro em células H727 utilizando nanopartículas. ....	125
5.3. Avaliação do efeito da expressão de DICER frente ao CS em células H727 previamente silenciadas para este gene. ....	129

6. CONCLUSÕES .....	130
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	131
Capítulo 3.....	137

# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente é notável a gama de estudos que buscam investigar produtos naturais isolados de plantas que protejam o DNA de danos, e, adicionalmente, elucidando os possíveis mecanismos pelos quais estes danos ao DNA são reduzidos. Desta forma, há trabalhos que avaliam a ativação de enzimas detoxificadoras como a quinona redutase (QR) (HOSHINO et al., 2010), atividade antígenotóxica (SKANDRANI et al., 2010) e/ou antimutagênica (MALINI et al., 2010), atividade antioxidante (MIGUEL et al., 2010), ativação de vias de reparo de DNA (DUARTE et al., 2009) entre outras atividades.

### 1.1. *Casearia sylvestris*

*Casearia sylvestris*, Swartz (Salicaceae) (CHASE et al., 2002) é uma árvore ou arbusto amplamente distribuída no Brasil desde o Amapá até o Rio Grande do Sul, sendo encontrada tanto no Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Seu nome popular mais conhecido é guaçatonga (Figura 1). Em terras internacionais é possível encontrar *C. sylvestris* no México e Antilhas (BASILE et al., 1990).

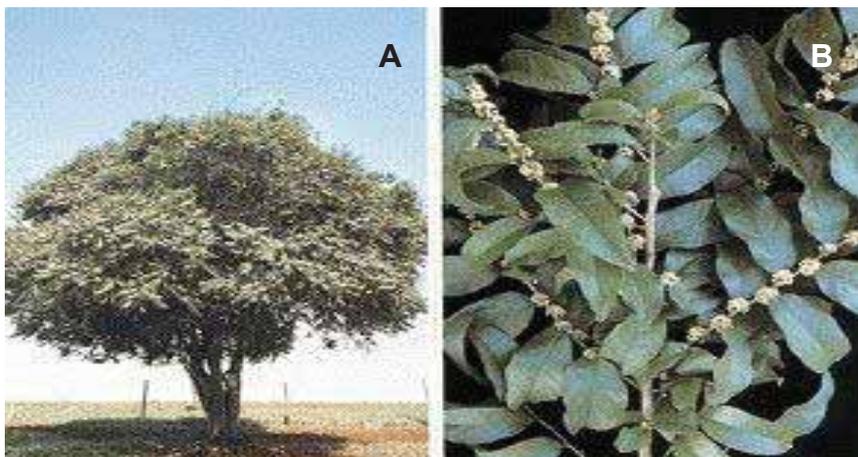


Figura 1: *Casearia sylvestris*. A) Imagem da árvore que possui de dois a seis metros de altura; B) Detalhe com maior aproximação das folhas.

Os produtos naturais de *C. sylvestris* são conhecidos por sua atividade antiinflamatória, propriedades cicatrizantes e antiúlcera (BASILE et al., 1990; BORGES et al., 2000; SERTIÉ et al., 2000). Outros estudos comprovaram a atividade citotóxica em células tumorais (BOLZANI et al., 1995; ORBELIES et al., 2002), atividade antifúngica (ORBELIES et al., 2002), e efeito dislipidêmico (SCHOENFELDER et al., 2008).

Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que entre diversos extratos avaliados de *C. sylvestris*, o extrato hexânico derivado de vários órgãos da planta foi o que apresentou maior caráter citotóxico apresentando IC<sub>50</sub> abaixo de 30 µg/mL em células de leucemia e carcinoma mamário (MESQUITA et al., 2009). Ainda com relação à atividade citotóxica, um estudo utilizando dois derivados de ácido gálico da *C. sylvestris* demonstrou atividade antitumoral e citotóxica *in vitro* utilizando o modelo de tumor de Erlich em camundongos e células de câncer de pulmão (SILVA et al., 2009). Derivados do ácido elágico a partir do extrato aquoso de *C. sylvestris* demonstraram atividade anti-fosfolipase A<sub>2</sub>, bloqueando alguns efeitos tóxicos de venenos de cobra (SILVA et al., 2008).

### 1.1.2. Diterpenos clerodânicos de *C. sylvestris*

Substâncias isoladas de plantas podem ser responsáveis por atividades biológicas específicas, desta forma, existe um grande interesse no isolamento destes metabólitos e na elucidação de seus efeitos biológicos.

Os diterpenos são metabólitos secundários encontrados na *C. sylvestris*. Estas substâncias recebem em sua maioria a denominação de casearinas A-Y (FERREIRA et al., 2011). Algumas atividades biológicas das casearinas já foram estudadas, entre elas pode-se citar as atividades citotóxica e antifúngica (FERREIRA et al., 2011). As casearinas A-R tiveram sua configuração absoluta determinada, enquanto para as casearinas S-Y apenas

a configuração relativa foi confirmada. Este estudo avaliou as casearinas B, D e X e a caseargrewiina F (Figura 2).

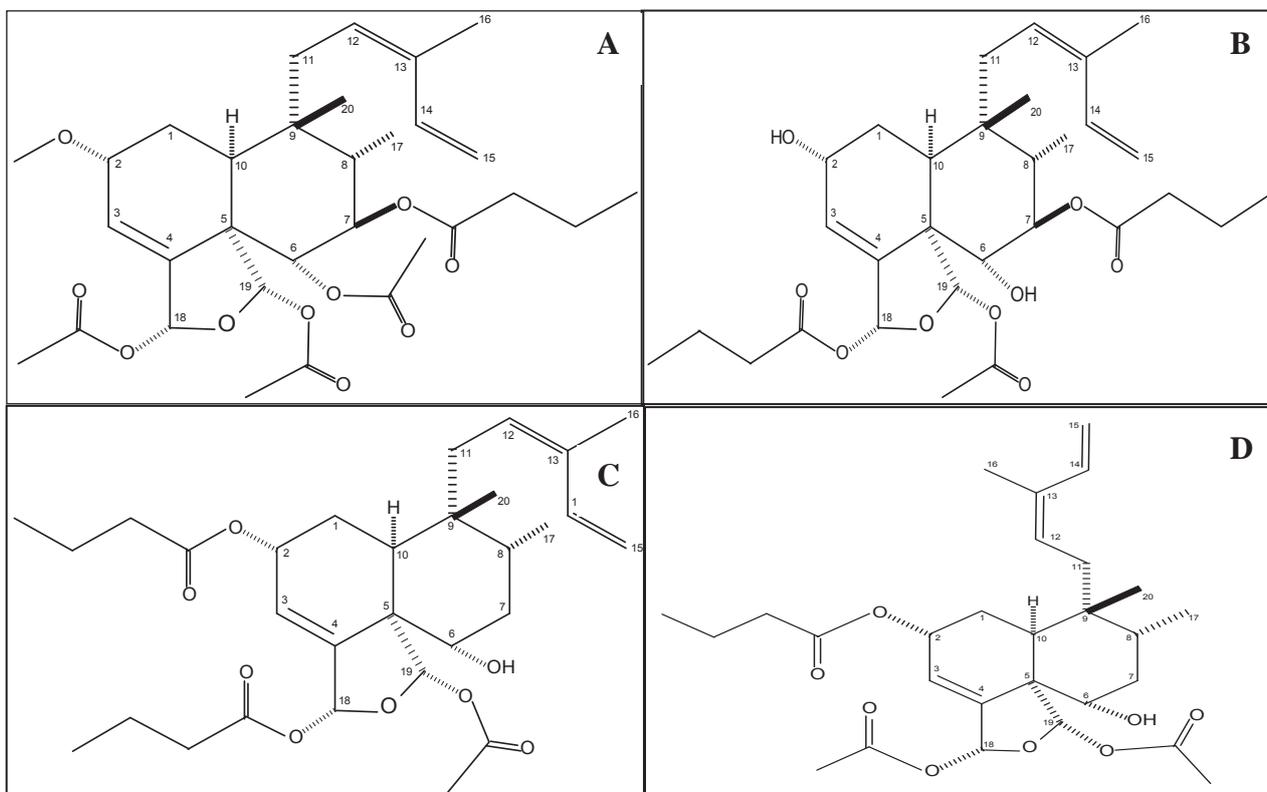


Figura 2: Fórmula estrutural dos diterpenos clerodânicos obtidos do extrato etanólico de *C. sylvestris* utilizados neste trabalho. A) casearina B; B) casearina D; C) casearina X; D) caseargrewiina F.

Com relação às casearinas B, D e X, e à caseargrewiina F há um estudo que descreve a atividade citotóxica desses produtos naturais e os produtos de degradação da casearina X. Tanto a casearina X, como as casearinas D e B são relatadas pelo mesmo estudo como um pó branco. A atividade citotóxica foi avaliada nas seguintes linhagens celulares: MOLT-4 (leucemia), MDA-MB-435 (câncer de mama), HCT-8 (câncer de colo), and SF-295 (glioblastoma), e L-929 (fibroblastos). Dentre essas substâncias, a caseargrewiina F se mostrou a mais citotóxica, apresentando  $IC_{50}$  em concentração menor que  $0,2 \mu\text{M}$  para a maioria das linhagens celulares (SANTOS et al., 2010). Ainda, um

estudo atual mostra que a casearina X foi capaz de induzir apoptose em células CEM e HL-60, derivadas de leucemia (FERREIRA et al., 2010).

Adicionalmente, a caseargrewiina F, foi descrita como um produto natural sólido, incolor e amorfo (KANOKMEDHAKUL et al, 2007). O mesmo estudo verificou que a caseargrewiina F não foi citotóxica para células de carcinoma epidermal. Entretanto, apresentou citotoxicidade em células de câncer de mama humano e células tumorais de pulmão (KANOKMEDHAKUL et al, 2007).

### **1.1.3. Produtos naturais extraídos de *C. sylvestris* e seus efeitos no DNA**

Mais especificamente com relação aos efeitos no DNA, há trabalhos que relataram a ausência de atividade genotóxica do extrato etanólico extraído das folhas de *C. sylvestris* no DNA das células HTC (hepatoma) e V79 (células pulmonares de hamster chinês) através método do cometa (MAISTRO et al., 2004). Já o óleo essencial das folhas demonstrou ausência de efeito mutagênico, quando avaliado pelo método de aberração cromossômica em células HTC (SOUSA et al., 2007). Um estudo, utilizando camundongos, demonstrou que o extrato etanólico de *C. sylvestris* e um de seus diterpenos clerodânicos a caseargrewiina F, foram capazes de proteger o DNA contra danos em baixas concentrações e apresentaram efeito genotóxico e mutagênico em altas concentrações (OLIVEIRA et al., 2009) . Recentemente, outro estudo, que utilizou *Tradescantia pallida* e camundongos como modelo, demonstrou que a casearina X, extraída do extrato etanólico de *C. sylvestris*, foi capaz de proteger o DNA contra danos provocados pelo extrato isolado de poluentes obtidos da fuligem oriunda da queima da cana-de-açúcar (PRIETO et al., 2012).

## 1.2. Mecanismos de antimutagênese

Segundo Morita et al (1978), os derivados de produtos naturais podem proteger o DNA de danos atuando como desmutagênicos, ou seja, agindo diretamente nos mutágenos ou em seus precursores. O principal mecanismo de ação de produtos naturais com estas características é a inativação química ou enzimática, ou seja, os produtos naturais atuam inibindo a ativação metabólica de pró-mutágenos ou inativando mutágenos já ativados através do mecanismo de *scavenging*.

De forma complementar, Kada (1983) propôs que os danos ao DNA podem ser reduzidos através de produtos naturais que atuam diretamente no processo de replicação ou na ativação do reparo de DNA, ficando estes produtos naturais conhecidos como bioantimutagênicos.

Portanto, trabalhos recentes visam elucidar os mecanismos de prevenção a danos no DNA ocasionado por produtos naturais através da avaliação atividade antioxidante (ZEGURA et al., 2011, FRANKIC et al., 2008); ativação de enzimas detoxificadoras de fase II, como é caso da glutathione-S transferase (PETERMANN et al., 2009) ou quinona redutase (DIETZ et al., 2005); ativação do sistema de reparo de DNA (DUARTE et al., 2009), ou até mesmo pela análise da expressão gênica global indicando possíveis genes responsáveis pelo efeito protetor previamente observado (KING et al., 2007).

## 1.3. Agentes causadores de danos ao DNA e mecanismos de redução ou remoção desses danos

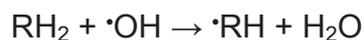
O DNA de células vivas pode ser lesado quando exposto a uma variedade de produtos naturais químicos e a um pequeno número de agentes físicos. A maioria dos danos são causados por agentes presentes no meio ambiente (danos ambientais), e

outros, são consequentes da própria fisiologia celular (danos espontâneos). Muitas vezes, é difícil distinguir os danos espontâneos dos danos ambientais, existindo a possibilidade de determinados danos serem classificados como espontâneos pelo fato de seu agente ambiental ainda não ter sido identificado. Cada modificação na estrutura molecular do material genético é designada com um dano ao DNA. Sendo que, os agentes desses danos podem ser classificados em agentes químicos ou físicos (FRIEDBERG et al., 2006). Este estudo enfoca o dano químico causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) e o dano físico causado por ultravioleta (UV).

### 1.3.1. Dano oxidativo ao DNA

Existem inúmeras fontes intra e extracelulares de ROS. A maior fonte intracelular de ROS está provavelmente associada com a redução do oxigênio à água, durante a respiração mitocondrial. As espécies altamente reativas incluem o radical hidroxila, o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio molecular *singlet*, assim como o hipoclorito, o radical de óxido nítrico e o peroxinitrito (CHANCE et al., 1979). Já as fontes extracelulares incluem radiação (radiação ionizante e a luz UV - principalmente de 320 a 380 nm), calor, várias drogas e produtos naturais químicos (FRIEDBERG et al., 2006).

Os radicais livres podem remover elétrons de resíduos de macromoléculas orgânicas de acordo com a seguinte reação geral:



Desta forma, os radicais livres são capazes de iniciar uma reação em cadeia que resulta em danos ao DNA a distâncias consideráveis da reação inicial (SARAN e BORS, 1990). A meia vida e a difusão dos radicais gerados são parâmetros importantes que podem influenciar no potencial para a geração do dano ao DNA. Os radicais peroxil ( $ROO\cdot$ )

e alcoxil ( $\text{RO}\cdot$ ) são os maiores intermediários de reações em cadeia, enquanto os peróxidos ( $\text{ROOH}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e resíduos hidroxilados ( $\text{ROH}$ ) e carbonilados ( $\text{HR}=\text{O}$ ) normalmente são produtos finais. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é provavelmente o mais significativo em termos de difusão. Apesar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por si só ser relativamente inerte, ele pode dar origem a radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) em um processo catalisado por íons de metais de transição, como é o caso do  $\text{Fe}^{2+}$ . Esta reação é conhecida como a reação de Haber-Weiss ou reação de Fenton (COHEN, 1985). Mais especificamente no DNA, a reação de Fenton pode ser representada da forma a seguir:



O ataque ao DNA por ROS gera uma variedade de produtos. Por exemplo, o radical hidroxila pode agir sobre o DNA originando quebras de simples fita e/ou quebra de dupla fita, assim como, lesões nas bases purínicas e pirimidínicas, afetando a integridade do genoma. A maioria dos produtos de dano oxidativo ao DNA foram identificados como: timina glicol, 5,6-dihidroxiuracila, 8-hidroxiadenina, 4,6-diamina-5-formamida-pirimidina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroxiuracila, 8-hidroxiguanina, 2,6-diamina-4-hidroxi-5-formamida-pirimidina (CROTEAU e BOHR, 1997) (Figura 3).

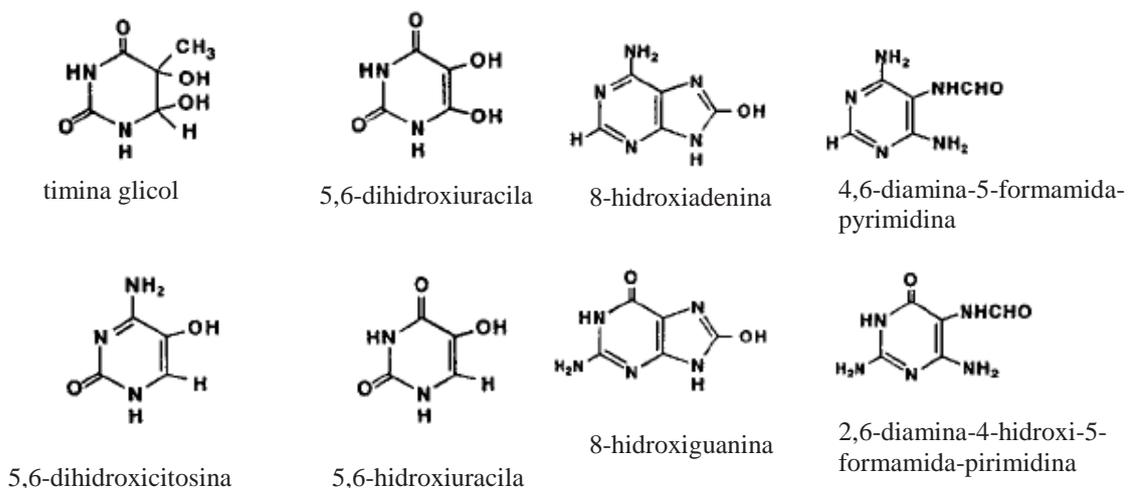


Figura 3: Exemplos de modificações oxidativas encontradas nas bases nitrogenadas de DNA de mamíferos (CROTEAU e BOHR, 1997).

### 1.3.2. Produtos naturais e enzimas com atividade antioxidante

Atualmente, o termo antioxidante vem sendo amplamente popularizado e ganhou publicidade entre a população como sendo sinônimo de benefícios à saúde (HUANG et al., 2005). Uma definição mercadologicamente relevante de antioxidante é: produto natural sintético ou natural que é adicionado a produtos, a fim de prevenir ou retardar sua deterioração pela ação do oxigênio do ar. Já em bioquímica e medicina, os antioxidantes são enzimas ou substâncias orgânicas, como a vitamina E e o  $\beta$ -caroteno, que são capazes de combater os efeitos deletérios da oxidação em tecidos animais (HUANG et al., 2005).

A atividade antioxidante está associada à diminuição do dano ao DNA, à redução da peroxidação lipídica e à inibição da proliferação de células tumorais *in vitro*. Ainda, pode-se associar produtos naturais antioxidantes com a diminuição epidemiológica de alguns tipos de câncer e doenças degenerativas como isquemia cardíaca e catarata (SIES e STHAL, 1995). Essa proteção aos tecidos biológicos se dá pelo combate às ROS.

Dentre os mecanismos responsáveis pela diminuição de ROS pode-se citar: a) remoção catalítica de ROS por agentes como a catalase, superóxido dismutase, peroxidase e antioxidantes tióis-específicos; b) ligação de proteínas (transferrina, metalotioneína, haptoglobinas, ceruloplasmina) a íons pró-oxidantes, como os íons de ferro e cobre; c) proteção contra danos macromoleculares por proteínas de estresse ou de choque térmico; d) redução dos radicais livres por doadores de elétrons como a glutathione S-transferase, vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) bilirrubina e ácido úrico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Há inúmeras ferramentas utilizadas para a avaliação da atividade antioxidante. Reações químicas que avaliam a capacidade antioxidante direta da molécula baseiam-se em características da substância em ser uma boa seqüestradora de elétrons. Dentre as

principais características pode-se citar a presença de ligações duplas conjugadas ou a presença de anéis benzênicos poliidroxilados. A capacidade antioxidante de um produto natural também pode estar relacionada à ativação de proteínas celulares que auxiliam na eliminação de ROS. Dessa forma, torna-se necessário avaliar os dois tipos de interações dos produtos naturais, a fim, de verificar se eles apresentam ou não caráter antioxidante. (HUANG et al., 2005).

### **1.3.3. Combate às lesões oxidativas no DNA**

O sistema de reparo de DNA é fundamental para a manutenção da estabilidade genética e conseqüentemente para a manutenção da vida. Ainda, a importância do reparo do DNA é evidente, visto o enorme investimento feito pelas células em enzimas de reparo (ALBERTS et al., 2008).

Uma vez que a vida animal depende de oxigênio, são gerados constantemente nos organismos vivos, agentes oxidantes derivados do próprio metabolismo, como por exemplo, radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e etc. Adicionalmente, radicais livres podem ser gerados frente a diversas patologias como o câncer, doenças cardiovasculares e etc. Dessa forma, os animais desenvolveram um complexo mecanismo enzimático antioxidante. Porém, este mecanismo não é perfeito, e alguns agentes oxidantes acabam encontrando uma forma de atingir algumas moléculas dentro das células, entre elas, o DNA. Já foi estimado que o genoma humano recebe cerca de 10000 “ataques” oxidativos por dia, que em sua maioria são removidos pelas DNA glicosilases (FRIEDBERG, 1995).

O reparo por excisão que é iniciado pelas glicosilases é chamado de reparo por excisão de bases (BER). Este evento enzimático inicial durante BER, geralmente origina outro tipo de dano ao DNA, pois resulta na formação de sítios abásicos, conhecidos como

sítios apurínicos ou apirimidínicos (AP). O reparo de sítios AP requer a ocorrência de outros eventos bioquímicos a fim de que se complete BER, que é um processo produto natural de diversas etapas (FRIEDBERG, 1995).

#### **1.3.4. Danos no DNA provocados por radiação UV**

O espectro de radiação UV é dividido em três diferentes bandas de comprimento de onda: UVA (400 a 315 nm), UVB (315 a 280 nm) e UVC (280 a 100 nm). A radiação solar consiste majoritariamente em raios UVA e UVB, uma vez que a camada de ozônio é capaz de barrar luz em comprimento de ondas inferiores a 285 nm. Entretanto, alguns estudos utilizam a luz germicida UVC de comprimento de onda aproximado de 260 nm (correspondente ao pico de absorção da molécula de DNA), uma vez que, lesões no DNA idênticas às causadas por UVA e UVB são induzidas mais eficientemente pela radiação UVC (FRIEDBERG et al., 2006).

Quando o DNA é exposto a radiações UV, pirimidinas adjacentes se ligam covalentemente formando estruturas em forma de anel conhecidas como dímero de pirimidina ciclobutano (CPD) ou dímero de ciclobutano dipirimidina (LOVE et al., 1986). Tradicionalmente, os CPDs geram a distorção da hélice de DNA obrigando a parada da replicação, como consequência, há uma distorção que provoca instabilidade nas pontes de hidrogênio do DNA e nenhuma base pode ser adicionada nessas condições (CHAN et al., 1985). O DNA irradiado com UV também pode apresentar sítios álcali-lábeis na região de citosinas (e muito menos frequentemente, timinas), localizadas na extremidade 3' de nucleosídeos de pirimidina. Essas lesões são conhecidas como pirimidina-pirimidona (6,4) fotoprodutos (6-4 PPs). Esse tipo de dano é altamente prejudicial ao DNA, uma vez que induz uma forte distorção na estrutura de dupla hélice (TAYLOR et al, 1988) (Figura 4).

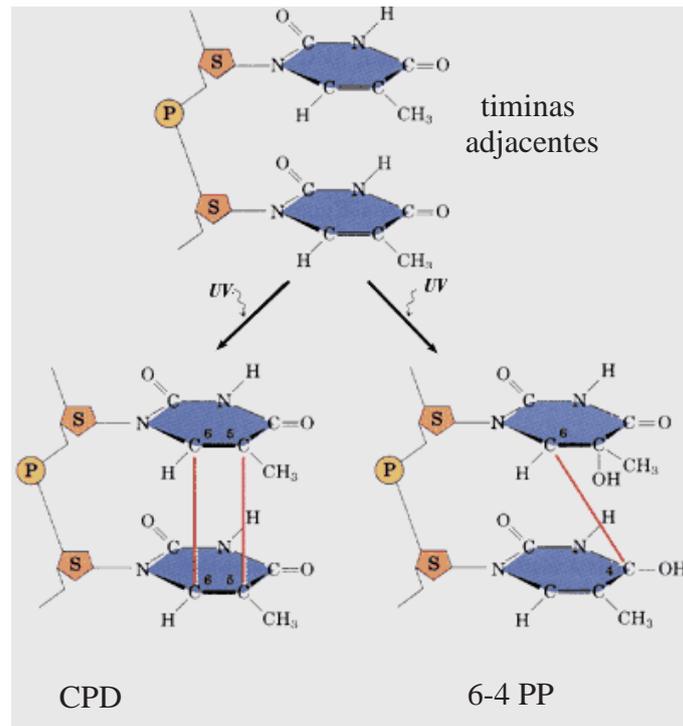


Figura 4: Fotolesões encontradas no DNA após irradiação com UV.

### 1.3.5. Reparo de lesões ocasionadas por UV - Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

A via de reparo mais comumente ativada em casos de danos induzidos por radiação UV é a via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). O evento que define NER é a excisão do dano de um oligonucleotídeo através da quebra da fita lesada no mesmo lado da lesão de DNA (FRIEDBERG et al., 2006). As lesões reparadas por NER são aquelas que basicamente formam aductos de DNA, podendo ser citados CPDs ou o 6,4-PP provocados por radiação UV, ou então as ligações cruzadas entre fitas que podem ser causadas tanto por ROS ambientais como endógenos (DRONKERT e KANAAR, 2001; NOLL et al., 2006).

O sistema NER em mamíferos consiste em duas vias: reparo global do genoma (GGR) e o reparo acoplado à transcrição (TCR). O último é especializado em remover

lesões da fita de DNA de genes ativos transcricionalmente. Em contraste, o reconhecimento do dano pelo GGR é dependente da ligação de complexos protéicos que possuem afinidade específica pelo DNA lesado. Dois produtos dos genes relacionados ao *Xeroderma pigmentosum* (XP), XPC e DDB2 (XPE) estão envolvidos no processo inicial de detecção do dano pela via de GGR (FRIEDBERG et al., 2006).

De forma geral, esses aductos de DNA causam alguma distorção local ou deformidade incomum na hélice. Esse tipo de distorção parece ser a primeira alteração estrutural reconhecida em células de mamíferos que geralmente requer a ligação do complexo XPC-RAD23B. Este complexo por sua vez, se liga ao DNA lesado em dois diferentes estágios. O primeiro, ocorre rapidamente através da ligação a regiões que não possuem ligação de hidrogênio na dupla fita de DNA por meio de dois domínios que possuem *hairpins* em XPC (TREGO e TURCHI, 2006; CAMENISCH et al., 2009), seguidos de um ancoramento mais forte a uma região não lesada da fita que contém o aducto (CAMENISCH et al., 2009). A ligação de XPC à região do DNA simples fita que possui poucas bases facilita o transporte de TFIIH ao sítio distorcido (ARAÚJO et al., 2001). Posteriormente, o complexo XPC-RAD23B interage fortemente com TFIIH que procura a menor distância do sítio lesado para se ancorar juntamente com outras proteínas do complexo pré-incisão (SUGASAWA et al., 2009).

Em seguida é dada continuidade ao o reparo de DNA por NER com excisão da região lesada e polimerização da nova fita de DNA reparada (Figura 5).

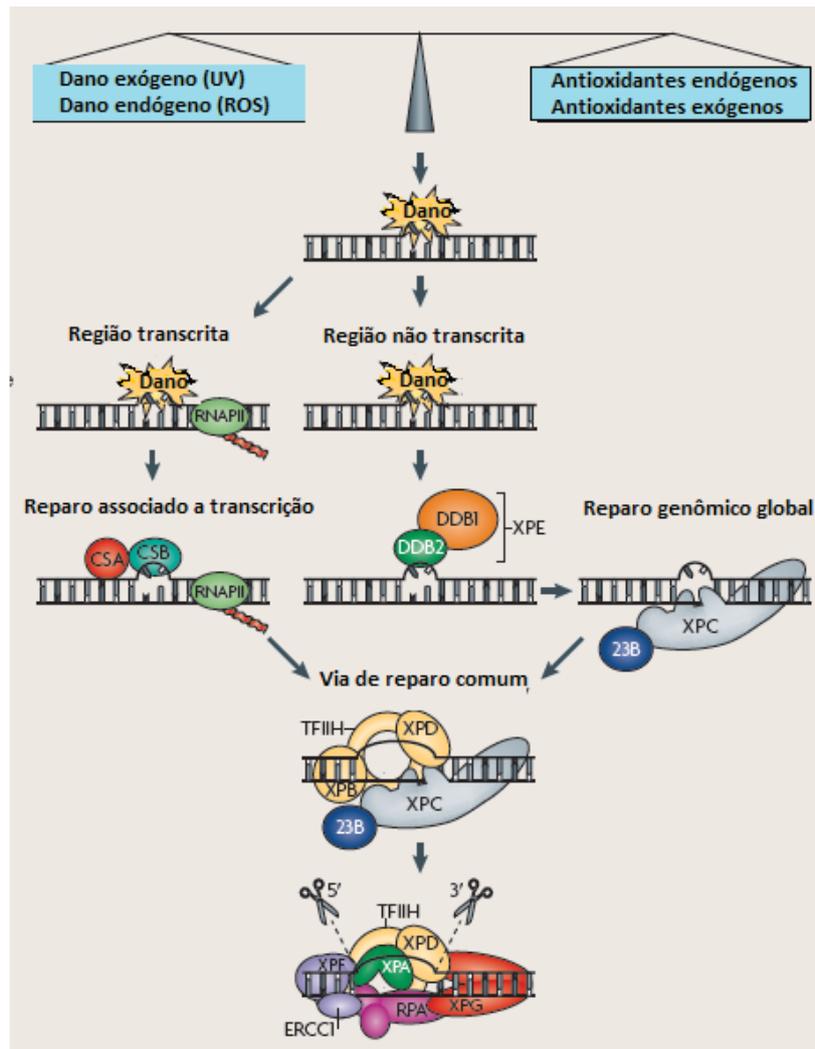


Figura 5: Algumas proteínas envolvidas na via de NER. (CLEAVER et al., 2009)

#### 1.4. Apoptose e reparo de DNA

Uma vez que ocorre um dano ao DNA, mecanismos de *checkpoint* são ativados desencadeando uma resposta celular que proporciona uma pausa no ciclo celular. Em seguida, dependendo do tipo e da severidade da lesão ao DNA e do estado fisiológico da célula, a resposta celular pode seguir dois caminhos: o primeiro, é a ativação do sistema de reparo de DNA, resultando na restauração de sua estrutura química original. Entretanto, se os danos ao DNA são muito severos, e portanto, não são reparados, a célula opta por se auto-eliminar através do processo de morte programada conhecido como apoptose (MASLOV e VIJG, 2009).

## 1.5. Ativação da enzima quinona redutase

Como já foi citado anteriormente, produtos naturais conhecidos como desmutagênicos podem reduzir danos ao DNA através da detoxificação dos mutágenos pela indução de enzimas detoxificadoras, como é o caso da enzima quinona redutase. A redução de quinonas eletrofilicas pela QR é uma via de detoxificação importante que converte quinonas a hidroquinonas e reduz a formação de agentes oxidativos. Os indutores enzimáticos podem ser classificados em dois tipos: monofuncionais e bifuncionais. Os indutores bifuncionais aumentam a expressão tanto de enzimas de fase I como de enzimas de fase II. Já os indutores monofuncionais induzem seletivamente enzimas de fase II que são responsáveis por ativar o elemento de resposta antioxidante (ARE) via indução de Keap1 e Nrf2. Uma vez que enzimas de fase I podem ativar procarcinógenos, é desejável que produtos naturais com atividade quimiopreventiva apresentem caráter monofuncional, ou seja, induzam apenas enzimas de fase II (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2002; EGGLER et al., 2000)

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis mecanismos de proteção aos danos no DNA assim como a genotoxicidade e citotoxicidade do extrato etanólico e substâncias isoladas de *C. sylvestris*.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a citotoxicidade dos produtos naturais através do ensaio de MTT e sobrevivência clonogênica nas linhagens HepG2, MRC5 e XP4PA nos tempos de 24 h e 48 h;

- 2) Avaliar a genotoxicidade dos produtos naturais nas linhagens HepG2 (hepatocarcinoma humano), MRC5 (fibroblasto de pulmão humano) e XP4PA (fibroblasto humano deficiente na proteína XPC de NER) no tempo de 24 h;
- 3) Avaliar a antigenotoxicidade dos produtos naturais frente ao mutágeno peróxido de hidrogênio na linhagem HepG2 pré e pós-tratada com os produtos naturais durante 24 h;
- 4) Avaliar a antigenotoxicidade dos produtos naturais frente ao mutágeno UVC nas linhagens MRC5 e XP4PA pré e pós-tratadas com os produtos naturais durante 24 h a fim de verificar uma possível atuação no mecanismo de NER;
- 5) Avaliar a possível inibição da apoptose pelos produtos naturais na linhagem celular HepG2 exposta ao mutágeno peróxido de hidrogênio através do método da anexina-V-FITC/PI;
- 6) Avaliar a possível inibição da apoptose pelos produtos naturais nas linhagens celulares MRC5 e XP4PA expostas ao mutágeno UVC através do método da anexina-V-FITC/PI;
- 7) Avaliar a possível atividade antioxidante através do pré-tratamento com os produtos naturais de *C. sylvestris* utilizando o fluoróforo DCFDA em células HepG2 expostas ao peróxido de hidrogênio;
- 8) Avaliar a possível indução da enzima quinona redutase pelos produtos naturais na linhagem Hepa 1c1c7 (hepatocarcinoma murino).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção do extrato etanólico de *C. sylvestris***

As folhas de *C. sylvestris* Swartz (Salicaceae) foram coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho (São Paulo) e as excidatadas de 3 indivíduos (AGS13, AGS19 e AGS23)

foram depositadas no herbário estadual "Maria Eneida P. Kaufmann", do Instituto Botânico de São Paulo. As folhas secas de *C. sylvestris* (20,5 kg) foram extraídas por maceração com etanol absoluto (2 x 100.0 L; 40 °C; tempo total de 23 h) e a solução obtida foi submetida à evaporação sob pressão reduzida e posterior secagem sob fluxo de ar em dessecador fornecendo o extrato etanólico seco. O extrato etanólico de *C. sylvestris* assim como as substâncias puras, foram fornecidos pelo Prof. Alberto José Cavalheiro, Departamento de Química Orgânica, do Instituto de Química de Araraquara (UNESP), juntamente com o Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

### **3.2. Obtenção dos diterpenos clerodânicos de *C. sylvestris***

O fracionamento do extrato etanólico foi realizado por extração em fase sólida (EFS), obtendo-se 3 frações. O fracionamento da fração 2 da EFS, por cromatografia em coluna, conduziu a obtenção 41 frações, que foram purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, resultando nas substâncias estudadas: casearina B, casearina D, caseargrewiina F e casearina X. Detalhes sobre o fracionamento em Santos et al., 2010.

### **3.3. Solubilização dos produtos naturais**

Os produtos naturais foram solubilizados em DMSO puro e mantidos a -20°C até o momento do uso. As concentrações das soluções-mãe preparadas foram as seguintes: extrato etanólico: 116 µg/mL, casearina B: 3,6 mM, casearina D: 18,2 mM, casearina X: 41,0 mM e caseargrewiina F: 4,5 mM. Posteriormente, essas soluções-mãe foram diluídas em solução de Hanks (KCl (5,4mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3 mM), NaHCO<sub>3</sub> (4,2

mM), Glicose (5,6 mM), NaCl (0,1 M)) resultando em outras soluções-mãe menos concentradas, que foram adicionadas ao meio de cultura de células (DMEM) para a realização dos experimentos. A segunda diluição em solução de Hanks foi feita a fim de atenuar a toxicidade do DMSO, uma vez que, se fosse feita outra diluição em DMSO, possivelmente teria-se que adicioná-lo em concentração superior a 1% nas células o que é sabidamente citotóxico. Adicionalmente, esta segunda diluição em Hanks tornou possível uma tomada de volume acessível às micropipetas, sem que houvesse um efeito citotóxico, genotóxico ou alteração da osmolaridade pelo veículo. Já que ao final, resultou em um veículo contendo no máximo 2% de solução de Hanks e 0,05% de DMSO diluídos nos meios de cultura de células utilizados nesse estudo, DMEM ou  $\alpha$ -MEM.

### 3.4. Cultura de células

As células HepG2 (hepatocarcinoma humano, que possui níveis indutíveis de enzimas detoxificadoras como a catalase, glutathione S transferase entre outras.) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro, as linhagens XP4PA (fibroblasto humano deficiente na proteína XPC do reparo por excisão de nucleotídeos – NER) e MRC5 (fibroblasto de pulmão humano, linhagem selvagem da XP4PA) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck – Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas – Departamento de Microbiologia e a linhagem Hepa 1c1c7 (hepatocarcinoma murino que possui níveis indutíveis de quinona redutase) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. John M. Pezzuto, Universidade do Havaí, EUA. As linhagens HepG2, XP4PA e MRC5 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Sigma<sup>®</sup>) e Hams-F10 (1:1) (Sigma<sup>®</sup>), já a linhagem Hepa 1c1c7 foi cultivada em meio  $\alpha$ -MEM (Sigma<sup>®</sup>), todos suplementados com 10% de soro fetal bovino (v:v) (Cultilab<sup>®</sup>) e solução de antibiótico antimicótico - Sigma<sup>®</sup> (1000U de penicilina, 100  $\mu$ g/mL de sulfato de

streptomicina e 0.25 µg/mL de anfotericina B), Sulfato de kanamicina - Sigma® (100 µg/mL). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.5. Avaliação da citotoxicidade

#### 3.5.1. Ensaio do MTT

Esse método foi aplicado a todas às linhagens celulares HepG2, MRC5 e XP4PA e foi realizado com o intuito de determinar concentrações que matem no máximo 20% das células, IC<sub>20</sub>. Adicionalmente foram determinados os IC<sub>50</sub> dos produtos naturais, a fim de comparar os resultados com os resultados já descritos na literatura. Os ensaios de citotoxicidade foram avaliados em 24 h e 48 h de tratamento para a determinação, respectivamente, do efeito concentração-resposta e tempo-resposta, e dessa forma, foi estabelecido o protocolo de tratamento das linhagens celulares, com os derivados de *C. sylvestris* (extrato etanólico e substâncias puras). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Para um primeiro rastreamento de concentrações, foram utilizadas diluições em escala exponencial que variavam de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>2</sup> µM. A partir dos resultados de citotoxicidade obtidos nesse ensaio preliminar, foram testados os produtos naturais entre as faixas citotóxicas e não citotóxicas. Foram avaliadas no mínimo cinco concentrações para cada produto natural e quando necessário, foram testadas mais concentrações, sendo que as concentrações testadas para a célula HepG2 foram: extrato etanólico: de 0,3 a 5,0 µg/mL, casearina B: de 0,7 a 10,0 µM, caseargrewiina F (0,8 a 12,0 µM), casearina D (0,08 a 10,0 µM), casearina X (0,2 a 28,0 µM). Já para a célula MRC5, as concentrações testadas foram: extrato etanólico (0,3 a 5,0 µg/mL), caseargrewiina F (0,002 a 1,2 µM), casearina D (0,2 a 10,4 µM), casearina B (0,02 a 10,0 µM) e casearina X (0,2 a 28,0 µM).

Na linhagem XP4PA foram testadas as seguintes concentrações: extrato etanólico (0,04 a 0,6 µg/mL), caseargrewiina F (0,05 a 0,8 µM), casearina D (0,08 a 1,3 µM), casearina B (0,2 a 2,5 µM) e casearina X (0,2 a 3,5 µM). Dessa forma, foram determinadas as concentrações máximas não citotóxicas. Como controle positivo foi empregada doxorrubicina 27 µM e controle de veículo 2% de solução de Hanks e 0,05% de DMSO diluídos em DMEM.

Após o tratamento com os produtos naturais, o meio de cultura foi removido e o protocolo do MTT foi realizado segundo Mosmann (1983). Inicialmente, 5 mg/mL de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) em PBS foram adicionados em cada poço da microplaca com 96 poços, as células na microplaca foram incubadas a 37°C, ao abrigo da luz durante 3 h para observação da presença dos cristais violetas de formazana. Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 590 nm, em leitor de placas. A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a viabilidade de cada tratamento.

$$\% \text{ células vivas} = (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do Controle negativo}) \times 100$$

### **3.5.2. Ensaio de sobrevivência clonogênica**

Esta técnica foi transmitida através de estágio realizado pela aluna no laboratório do Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck (ICB, USP). Foram realizados três experimentos independentes nas linhagens HepG2, XP4PA e MRC5 nos tempos de 24 h e 48 h. Como controle positivo, foi utilizada doxorrubicina 27 µM e controle de veículo 2% de solução de Hanks e 0,05% de DMSO diluídos em DMEM. Neste ensaio, as células foram tratadas já com uma concentração acima do IC<sub>20</sub>, concentração igual ao IC<sub>20</sub> e uma concentração

abaixo do IC<sub>20</sub> obtido previamente no teste do MTT. Dessa forma, foram avaliadas no mínimo três concentrações para cada produto natural, nos tempos de 24 h e 48 h nas linhagens celulares XP4PA, MRC5 e HepG2.

Este experimento foi realizado segundo Ballal et al (2009) com algumas modificações. O tratamento das células foi realizado exatamente como foi feito no ensaio de MTT. Foram plaqueadas  $2,5 \times 10^5$  células/mL e então as células foram tratadas. Após os tempos de tratamento, as células foram contadas em câmara de Neubauer, a fim de obter o volume que contivesse 1000 células. Posteriormente esse volume foi adicionado a placas de 60 mm que continham previamente 4mL de DMEM. As células foram deixadas para se multiplicarem por 6 dias, permitindo assim que formassem colônias suficientes para a análise posterior. Em seguida, as placas foram fixadas com formol 10% por 20 min, e depois coradas com cristal violeta por mais 20 min. Decorrido esse tempo, as placas foram enxaguadas em água corrente e após secarem, as colônias com mais de 15 células foram contabilizadas em estereomicroscópio no aumento de 16X. A porcentagem de colônias que proliferaram foi calculada da seguinte forma:

Eficiência de Plaqueamento (EP) = (N colônias contadas)/(N de colônias plaqueadas)

% sobrevivência = [(N colônias do teste/N de colônias do Controle negativo) x (EP)]x100

### **3.6. Ensaio do cometa**

Para este teste, as células foram tratadas como descrito posteriormente para os ensaios de genotoxicidade e antigenotoxicidade. Cada tratamento foi realizado em triplicata segundo o protocolo previamente estabelecido por Singh et al. (1988). Lâminas limpas pré-tratadas com agarose ponto de fusão normal, receberam uma mistura de

agarose baixo ponto de fusão (37 °C) juntamente com as células ( $2,5 \times 10^4$ ). Posteriormente, foi colocado 100  $\mu$ L entre lâmina e lamínula, após a solidificação, a lamínula foi retirada da lâmina, mergulhando a lâmina em solução de lise (NaCl (2,4 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), DMSO (10%) e Triton X-100 (1%)), *overnight*. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com tampão da enzima FPG, e, posteriormente, incubadas por 30 minutos com a enzima FPG (1:3000 – v:v) em câmara úmida a 37°C. Em continuidade, a eletroforese alcalina foi realizada a 4 °C, cobrindo as lâminas em cuba de eletroforese com tampão de corrida (NaOH (300 mM), EDTA (1 mM), pH>13), correndo por 20 minutos, a 25 V. Depois, as lâminas foram lavadas em solução de neutralização (Tris (0.4 M), pH = 7.5), por fim fixadas em etanol absoluto. As lâminas foram coradas com brometo de etídio e lidas em um microscópio de fluorescência com filtro de 516-560 nm, e barreira de 590 nm em aumento total de 400X. Foram capturadas imagens de 50 nucleóides por alíquota de células e analisadas pelo software *TriTek CometScore*<sup>®</sup> versão 1.5. O parâmetro adotado no presente estudo foi a porcentagem de DNA na cauda. Os experimentos foram realizados em triplicata e dois experimentos independentes.

### 3.6.1. Cálculo da concentração do peróxido de hidrogênio

Para os experimentos do cometa, foi utilizado peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) da Merck<sup>®</sup>, padrão analítico que fica armazenado na geladeira em frasco plástico protegido da luz. Foi realizado o cálculo de sua concentração através de leitura espectrofotométrica, segundo método descrito por Brestel (1985). Primeiramente foi adicionado 11  $\mu$ L de peróxido em 4989  $\mu$ L de água miliQ, homogeneizados e em seguida foi realizada a leitura de absorbância a 230 nm. Para calcular a concentração de peróxido foi empregada a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração} = \text{Absorbância}/\varepsilon \qquad \varepsilon_{230} = 80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$\varepsilon_{230}$  = constante para a absorvância de 230nm

### 3.6.2. Atividade genotóxica dos produtos naturais de *C. sylvestris*

Foi realizada a atividade genotóxica dos produtos naturais em concentrações abaixo de seu IC<sub>50</sub> previamente determinado pelo ensaio do MTT. Primeiramente as células aderiram durante 24 h em placas de 24 poços. Em seguida, as soluções dos produtos naturais foram diluídas na razão de 1:2 ou 1:4 (v:v), utilizando-se no mínimo 5 concentrações, sendo que as concentrações testadas para HepG2 foram de extrato etanólico: 0,3 a 4,6 µg/mL, substâncias puras 0,3 a 4,6 µM. Na linhagem MRC5 a concentração de extrato etanólico foi de 0,01 a 2,50 µg/mL, e substâncias puras: 0,01 a 2,50 µM. Por fim, a linhagem XP4PA foi exposta às seguintes concentrações dos produtos naturais: extrato etanólico (0,01 a 1,50 µg/mL); substâncias puras (0,01 a 1,50 µM). Adicionalmente foram realizados: controle negativo (células com DMEM, ou seja, meio de cultura, usado nas células a fim de verificar a resposta das células em seu estado de cultivo corriqueiro), controle de veículo (DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM) e controle positivo, a fim de verificar a resposta genotóxica das células frente a um mutágeno clássico (células tratadas com o mutágeno e DMEM). No caso da linhagem HepG2 o mutágeno utilizado foi o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 1mM. Para a linhagem MRC5 foi utilizado UVC a 26,45 J/m<sup>2</sup> para a linhagem XP4PA a dose de UVC foi de 3,59 J/m<sup>2</sup>.

As concentrações dos mutágenos utilizados, tanto no ensaio de genotoxicidade como de antigenotoxicidade, foram previamente padronizadas baseadas na sua capacidade de induzir significativamente danos genotóxicos através do ensaio do cometa. Ressaltando que sempre que as células foram irradiadas, as mesmas eram lavadas com

PBS por duas vezes e, em seguida, cerca de 2 mL de PBS era adicionado para a realização da irradiação.

### **3.6.3. Atividade antigenotóxica dos produtos naturais de *C. sylvestris***

Neste ensaio foi realizado o pré e o pós-tratamento com os produtos naturais frente aos mutágenos. No caso da linhagem HepG2, o mutágeno utilizado foi o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) e os ensaios foram realizados em placas de 24 poços. Entre cada tratamento, foram realizadas lavagens das células com solução de Hanks. A linhagem MRC5 foi irradiada com UVC a 26,45 J/m<sup>2</sup> e para a linhagem XP4PA a dose de UVC utilizada foi de 3,59 J/m<sup>2</sup> e estes ensaios foram realizados em placas de 35 mm de diâmetro a fim de obter uma irradiação uniforme dos tratamentos. As concentrações escolhidas para este ensaio foram abaixo do IC<sub>20</sub>, previamente obtido nos ensaios de MTT e sobrevivência clonogênica; quando os IC<sub>20</sub> variavam de um ensaio para o outro, as células foram tratadas na concentração do menor IC<sub>20</sub> obtido. Foram avaliadas no mínimo 5 concentrações para cada produto natural. Portanto, foram testadas as seguintes concentrações na linhagem HepG2: extrato etanólico (0,02 a 0,30 µg/mL), substâncias puras (0,02 a 0,30 µM); para a linhagem MRC5: extrato etanólico (0,0002 a 0,04 µg/mL), substâncias puras (0,0002 a 0,04 µM) e para a linhagem XP4PA: extrato etanólico (0,001 a 0,02 µg/mL) e substâncias puras (0,001 a 0,02 µM).

Para as linhagens MRC5 e XP4PA foi realizado o ensaio, com e sem a incubação, dos produtos naturais com o pool de enzimas S9 (Moltox<sup>®</sup>) na concentração não citotóxica de 0,01 mg de proteína/mL de meio, a fim de verificar se a metabolização dos produtos naturais influenciava na possível atividade antigenotóxica. Adicionalmente, foram realizados: controle negativo (células sem tratamento mantidas em DMEM), controle positivo (células tratadas com o mutágeno e pré ou pós-tratadas com DMEM) e controle de

veículo com mutágeno (células tratadas com o mutágeno e pré ou pós-tratadas com DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM).

Em seguida foram realizados os procedimentos já descritos para o ensaio do cometa com utilização da endonuclease específica para danos oxidativos, FPG (New England® - 1:3000 – v:v) para a linhagem HepG2, e endonuclease específica para CPDs, T4-endonuclease V (gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck – 1:5000 – v:v), no caso de ensaios com as linhagens XP4PA e MRC5. Após a lise celular, as lâminas foram lavadas com o tampão específico de cada enzima (3 lavagens de 5 min), e, posteriormente, incubadas a 37°C durante 30 min em câmara úmida.

Adicionalmente, a porcentagem de inibição de danos para todas as concentrações foi calculada seguindo a fórmula proposta por Hosseinimehr e Karami (2004), e em seguida foi classificada como: forte (acima de 60%), moderada (41-60%), fraca (21-40%) e negligenciável (0-20%) (CALOMME et al., 1996).

$$\text{Inibição (\%)} = (1 - (\text{Teste/Controle de Veículo})) \times 100$$

### **3.7. Ensaio de morte celular – Anexina-V-FITC/PI**

Primeiramente, a concentração dos mutágenos e o tempo que a célula leva para entrar em apoptose foram padronizados. O princípio do método se baseia no fato de que em células saudáveis, o fosfolípido fosfatidilserina está localizado na face interna da membrana celular, entretanto, frente a um estímulo de morte celular, este fosfolípido é prontamente externalizado. A anexina-V é uma proteína que apresenta elevada atividade anticoagulante dependente de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e com uma alta afinidade por aminofosfolídeos, ou seja, alta afinidade pela fosfatidilserina. Já o iodeto de propídeo (PI) é prontamente transportado para o interior das células que estão em estado avançado de morte, uma vez

que estas células tem a integridade de sua membrana citoplasmática prejudicada (OTSUKI, 2000). Portanto, segundo Otsuki (2000), utilizando-se anexina-V conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o fluoróforo PI é possível distinguir os seguintes tipos celulares: células vivas (baixa concentração de anexina-V e baixa concentração de PI), apoptose precoce (elevada concentração de anexina-V e baixa concentração de PI), apoptose tardia/necrose (elevada concentração de anexina-V e elevada concentração de PI) (Figura 6). Dessa forma, as células foram pós-tratadas com os produtos naturais nas condições descritas a seguir.

A densidade celular utilizada neste ensaio foi de  $2,5 \times 10^5$  células/mL em três experimentos independentes. Foram realizados controle negativo (células sem tratamento, mantidas em DMEM), controle positivo (células tratadas com o mutágeno e pós-tratadas com DMEM) e controle de veículo com mutágeno (células tratadas com o mutágeno e pós-tratadas com DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM). Foram avaliadas no mínimo 5 concentrações para este ensaio. A linhagem HepG2 foi submetida ao  $H_2O_2$  (1mM) e pós-tratada com os produtos naturais durante 24 h nas concentrações: extrato etanólico (0,08 a 0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) e substâncias puras (0,08 a 0,3  $\mu\text{M}$ ). Já a linhagem MRC5 foi irradiada com UVC (Vilber-Lourmat<sup>®</sup>, Alemanha) ( $26,5 \text{ J/m}^2$ ) e tratada com os produtos naturais por 24 h nas concentrações: extrato etanólico (0,003 a 0,04  $\mu\text{g/mL}$ ) e substâncias puras (0,003 a 0,04  $\mu\text{M}$ ). Por fim, a linhagem XP4PA foi irradiada com UVC ( $3,59 \text{ J/m}^2$ ) e tratada com os produtos naturais nas concentrações: extrato etanólico (0,001 a 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ) e substâncias puras (0,001 a 0,005  $\mu\text{M}$ ). O sobrenadante das células foi recolhido em tubos de centrifuga de 2 mL; em seguida, as células foram lavadas com PBS, que também foi recolhido, e posteriormente tripsinizadas. Os tubos foram levados para centrifugação a 200 x g por 3 minutos e o sobrenadante foi removido. Depois, o ensaio de apoptose foi executado utilizando-se o kit de anexina-V-FITC/PI para detecção de apoptose

(eBioscience®). As células foram ressuspensas em 190 µL de tampão de ligação, foram adicionados 5 µL da solução de anexinaV-FITC e incubado por 10 min, em seguida foram adicionados 10 µL da solução de PI e procedeu-se a leitura no aparelho de citometria de fluxo BD FACSCanto®.

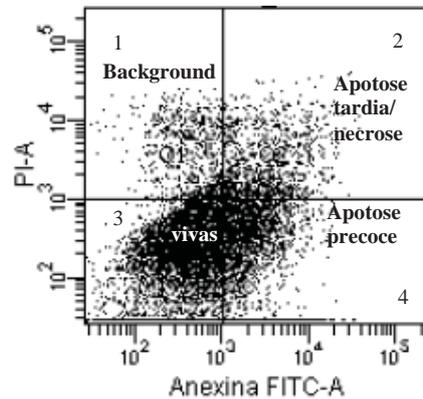


Figura 6: Classificação dos tipos celulares presentes no ensaio de apoptose por anexina-V-FITC/PI segundo Otsuki (2000).

### 3.8. Análise da atividade antioxidante em células HepG2 utilizando DCFDA

Foram plaqueados 100 µL de suspensão de HepG2 ( $5 \times 10^4$  células/mL) em placas pretas de 96 poços, estéreis. Em seguida, as células foram tratadas com os produtos naturais em três concentrações: 0,04; 0,08 e 0,15 µg/mL para o extrato etanólico e 0,04; 0,08 e 0,15 µM para as substâncias puras (casearinas B, D e X e caseargrewiina F), durante 24 h. As concentrações dos produtos naturais foram escolhidas baseando-se nos resultados de citotoxicidade e genotoxicidade previamente obtidos. Ainda, para o experimento foram feitos os seguintes controles: 1) controle negativo (CN) (células mantidas em meio de cultura - DMEM); 2) controle de veículo com mutágeno (CVM) (células tratadas com DMEM acrescido de DMSO 0,05% em Hanks 2%); 3) controle de quercetina (Q), um antioxidante derivado de produto natural (40 µM) por 24 h. Depois do

tratamento, os poços foram lavados com solução de Hanks duas vezes. Em seguida foi adicionada 100 µL de uma solução de DCFDA a 5 µM também diluída em Hanks e houve incubação por 30 minutos a 37°C protegidos da luz. Posteriormente, adicionou-se peróxido de hidrogênio 1mM, por 10 minutos, que após esse tempo foi removido. Os poços foram lavados por duas vezes com Hanks e em seguida, adicionou-se 100 µL de Hanks em cada poço para a leitura em fluorímetro. A leitura foi realizada durante 30 minutos a cada 1 minuto. Os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) utilizados foram: excitação: 485 nm, emissão: 528 nm. (Nakajima et al., 2009). Os experimentos foram realizados em triplicata sendo três independentes.

### **3.9. Análise da indução da enzima quinona redutase**

O método foi realizado segundo descrito por Prochascka e Santamaria (1988). Para o ensaio foi utilizada a linhagem Hepa 1c1c7, 200 µL de uma suspensão celular na concentração de  $1 \times 10^4$  células/mL, foram plaqueados em placas de 96 poços. Vale a pena ressaltar que, foram realizados três experimentos independentes, cada um com duas placas, uma para o ensaio de QR e outra para testar a viabilidade dos produtos naturais através do ensaio de cristal violeta (cv). As células foram incubadas com os produtos naturais por 48 h e, em seguida, foi realizado o ensaio de QR. O meio foi removido e foram adicionados 50 µL da solução de lise composta por digitonina por 10 min a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, em seguida, a placa foi submetida agitação por 10 min a 25°C. A QR citosólica foi mensurada pela conversão de glicose 6-fosfato+NADP a 6-fosfogluconato+NADPH pela 6-fosfato desidrogenase. Posteriormente, foi adicionada menadiona que reagiu com NADPH, formando menadiol+NADP. Esta última reação foi catalisada pela QR e a formação do menadiol foi detectada pela redução do sal de MTT, o que mensura indiretamente a

atividade da QR. Depois de 5 min, foi realizada leitura a 595 nm em leitor de placas. Em paralelo, foi feita uma placa de células tratadas na mesma condição do experimento e posteriormente coradas com solução de cv 0,2%, seguidas de adição de 5% de SDS em 50% de etanol, por fim foi realizada a leitura a 595 nm em leitor de placas. Dessa forma, estimou-se a citotoxicidade dos produtos naturais na linhagem Hepa 1c1c7. Foram realizados o controle branco, o controle de veículo tratado com DMSO 0,05% e Hanks 2% em  $\alpha$ -MEM e o controle positivo tratado com 6-naftoflavona (0,1  $\mu$ M) que é um potente indutor da quinona redutase. As concentrações dos produtos naturais utilizadas foram baseadas no IC<sub>20</sub> obtido na linhagem HepG2, uma vez que a mesma possui características semelhantes à Hepa 1c1c7, para o tempo de 48 h como segue: extrato etanólico (0,04 a 0,70  $\mu$ g/mL), casearina B (0,04 a 0,61  $\mu$ M), casearina D (0,01 a 0,21  $\mu$ M), caseargrewiina F (0,03 a 0,44  $\mu$ M) e casearina X (0,006 a 0,09  $\mu$ M). Em seguida, foi calculado o índice de redução (IR) do menadiol que indiretamente mede a atividade da quinona redutase, comparando os grupos teste e controle positivo com o controle de veículo, todos descontados do controle branco. O produto natural é considerado um bom indutor de quinona redutase quando seu IR é maior ou igual a 2. A viabilidade dos produtos naturais foi obtida através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ células vivas} = (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do Controle negativo}) \times 100$$

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios de citotoxicidade os IC<sub>20</sub> e IC<sub>50</sub> foram calculados através da análise de regressão das curvas concentração-resposta, utilizando-se o programa OriginLab® 8.0 Pro (Massachusetts, EUA). Já para o ensaio do cometa, a avaliação estatística foi realizada através da análise da porcentagem de DNA na cauda. Uma vez que as

freqüências baseadas na cauda do cometa não apresentam distribuição normal (BAUER et al., 1998), foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparação entre os grupos tratados e o controle de veículo (genotoxicidade) e veículo com mutágeno (antigenotoxicidade). Para o ensaio de morte celular por anexina-V/PI e para o ensaio de atividade antioxidante, os grupos tratados foram comparados com o controle de veículo com mutágeno através do teste *One-way* ANOVA pós-teste de Dunnett. Para todos os testes o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . O software utilizado para a análise estatística foi o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 (Califórnia, EUA).

Especificamente para o ensaio de atividade antioxidante, foi plotada a curva da intensidade de fluorescência em função do tempo e a partir dessa curva, calculou-se a intensidade de fluorescência total para cada tratamento através da obtenção da integral de cada curva (área sob a curva), utilizando-se o programa OriginLab 8.0.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Avaliação da citotoxicidade pelos ensaios de MTT e sobrevivência clonogênica**

Na tabela 1 pode-se observar a comparação dos ICs obtidos nas diferentes linhagens celulares no tratamento de 24 h. Verifica-se que todos os produtos naturais foram menos citotóxicos para a linhagem HepG2 se comparada com as demais linhagens. Comparando as células XP4PA e MRC5, no geral, os produtos naturais foram mais citotóxicos para a linhagem XP4PA. Dentre as substâncias puras, aquela que se demonstrou mais citotóxica para a linhagem HepG2 foi a casearina D, ( $IC_{50}$  de 4,11  $\mu$ M). Já a caseargrewiina F foi a mais citotóxica para a linhagem MRC5 ( $IC_{50}$  = 0,15  $\mu$ M), com um alto efeito antiproliferativo observado pelo ensaio de sobrevivência clonogênica ( $IC_{20}$  = 0,006  $\mu$ M). Na linhagem XP4PA observou-se maior citotoxicidade na casearina B ( $IC_{50}$  = 0,61  $\mu$ M) e elevado efeito antiproliferativo na caseargrewiina F ( $IC_{20}$  = 0,005  $\mu$ M).

Tabela 1: Comparação entre as concentrações inibitórias obtidas no tempo de 24 h para os produtos naturais derivados de *C. sylvestris* nas linhagens HepG2, MRC5 e XP4PA.

	HepG2			MRC5			XP4PA		
	MTT		SC	MTT		SC	MTT		SC
	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>20</sub>
<b>E ( µg/mL)</b>	0,82	9,2	0,82	1,29	2,19	1,29	0,08	0,21	0,08
<b>B ( µM)</b>	2,3	5,93	2,3	0,68	0,78	0,34	0,18	0,61	0,09
<b>D ( µM)</b>	1,45	4,11	1,45	1,50	5,15	1,50	0,36	1,13	0,36
<b>F ( µM)</b>	2,55	4,92	2,55	0,09	0,0015	0,006	0,18	0,90	0,005
<b>X ( µM)</b>	2,62	5,05	2,62	2,45	2,90	1,23	0,46	3,00	0,46

B = casearina B, D = casearina D, E = extrato etanólico, F = caseargrewiina F, X = casearina X, SC = sobrevivência clonogênica

Na tabela 2 tem-se demonstrada a comparação dos ICs obtidos nas diferentes linhagens celulares testadas no tratamento de 48 h. De modo geral, os produtos naturais foram menos citotóxicos na linhagem HepG2 se comparados com a MRC5 e a XP4PA. O produto natural mais citotóxico para a linhagem HepG2 entre as substâncias puras foi a casearina X (IC<sub>50</sub> = 0,81 µM), sendo que o produto natural que apresentou o maior efeito antiproliferativo avaliado pelo ensaio de sobrevivência clonogênica foi a casearina X (IC<sub>20</sub> = 0,09 µM). Já na linhagem MRC5, a caseargrewiina F se mostrou a mais citotóxica (IC<sub>50</sub> = 0,06 µM) e a com maior efeito antiproliferativo (IC<sub>20</sub> = 0,0015 µM), apresentando resultados de IC<sub>20</sub> diferentes entre os experimentos de MTT e sobrevivência clonogênica. Já para a linhagem XP4PA, a caseargrewiina F foi a mais citotóxica (IC<sub>50</sub> = 0,77 µM), enquanto que a casearina B apresentou o maior efeito antiproliferativo (IC<sub>20</sub> = 0,03 µM).

Tabela 2: Comparação entre as concentrações inibitórias obtidas no tempo de 48 h para os produtos naturais derivados de *C. sylvestris* nas linhagens HepG2, MRC5 e XP4PA

	HepG2			MRC5			XP4PA		
	MTT		SC	MTT		SC	MTT		SC
	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>20</sub>
<b>E ( µg/mL)</b>	0,70	1,39	0,70	0,78	1,09	1,56	0,17	0,52	0,17
<b>B ( µM)</b>	0,61	1,52	0,61	0,33	0,56	0,17	0,51	1,40	0,03
<b>D ( µM)</b>	0,21	1,08	0,21	1,17	3,13	1,17	0,52	1,30	0,26
<b>F ( µM)</b>	1,76	2,46	0,44	0,03	0,06	0,0015	0,12	0,77	0,12
<b>X ( µM)</b>	0,37	0,81	0,09	0,89	1,25	0,06	0,84	0,95	0,84

B = casearina B, D = casearina D, E = extrato etanólico, F = caseargrewiina F, X = casearina X, SC = sobrevivência clonogênica.

## 5.2. Ensaio de genotoxicidade dos produtos naturais de *C. sylvestris*

Este experimento foi realizado para avaliar a genotoxicidade dos produtos naturais em concentrações inferiores ao IC<sub>50</sub> previamente determinado pelo ensaio de MTT, com a finalidade de posteriormente realizar o ensaio de antigenotoxicidade em concentrações não genotóxicas e pouco citotóxicas (abaixo do IC<sub>20</sub> previamente determinado pelos ensaios de MTT e sobrevivência clonogênica). Vale a pena ressaltar que este experimento foi conduzido utilizando incubação com a enzima FPG que auxilia na detecção de possíveis danos oxidativos provocados pelos produtos naturais. Portanto, na figura 7 estão demonstrados os resultados de genotoxicidade nas linhagens HepG2, MRC5 e XP4PA tratadas por 24 h com os produtos naturais de *C. sylvestris*. Pode-se observar que para todas as linhagens os produtos naturais foram genotóxicos em todas as concentrações

testadas, apresentando padrão concentração-resposta. Ainda, ressalta-se que foram feitos experimentos com duas concentrações menores do que as apresentadas nos gráficos e que as mesmas não foram genotóxicas, entretanto, não foram plotadas a fim de facilitar a visualização dos resultados. Em geral, o produto natural que se mostrou mais genotóxico na linhagem HepG2, foi o extrato etanólico seguido da casearina B. Já para a linhagem MRC5, a caseargrewiina F foi a mais genotóxica, e claramente, a casearina X a menos genotóxica. Na linhagem XP4PA observa-se uma alta genotoxicidade do extrato etanólico a partir da concentração de 0,38 µg/mL, sendo que os produtos naturais casearina B e caseargrewiina F apresentaram elevada genotoxicidade na concentração de 1,5 µM. Ao se fazer uma comparação entre o potencial genotóxico dos produtos naturais nas maiores concentrações testadas para cada linhagem celular, obtém-se os seguintes resultados em ordem crescente de genotoxicidade: linhagem HepG2 (4,6 µM/ µg/mL): casearina D < caseargrewiina F < casearina X < casearina B < extrato etanólico. Linhagem MRC5 (2,5 µM/ µg/mL) casearina X < casearina B < casearina D < extrato etanólico < caseargrewiina F. Linhagem XP4PA (1,5 µM/ µg/mL): casearina D < casearina X < caseargrewiina F < extrato etanólico < casearina B.

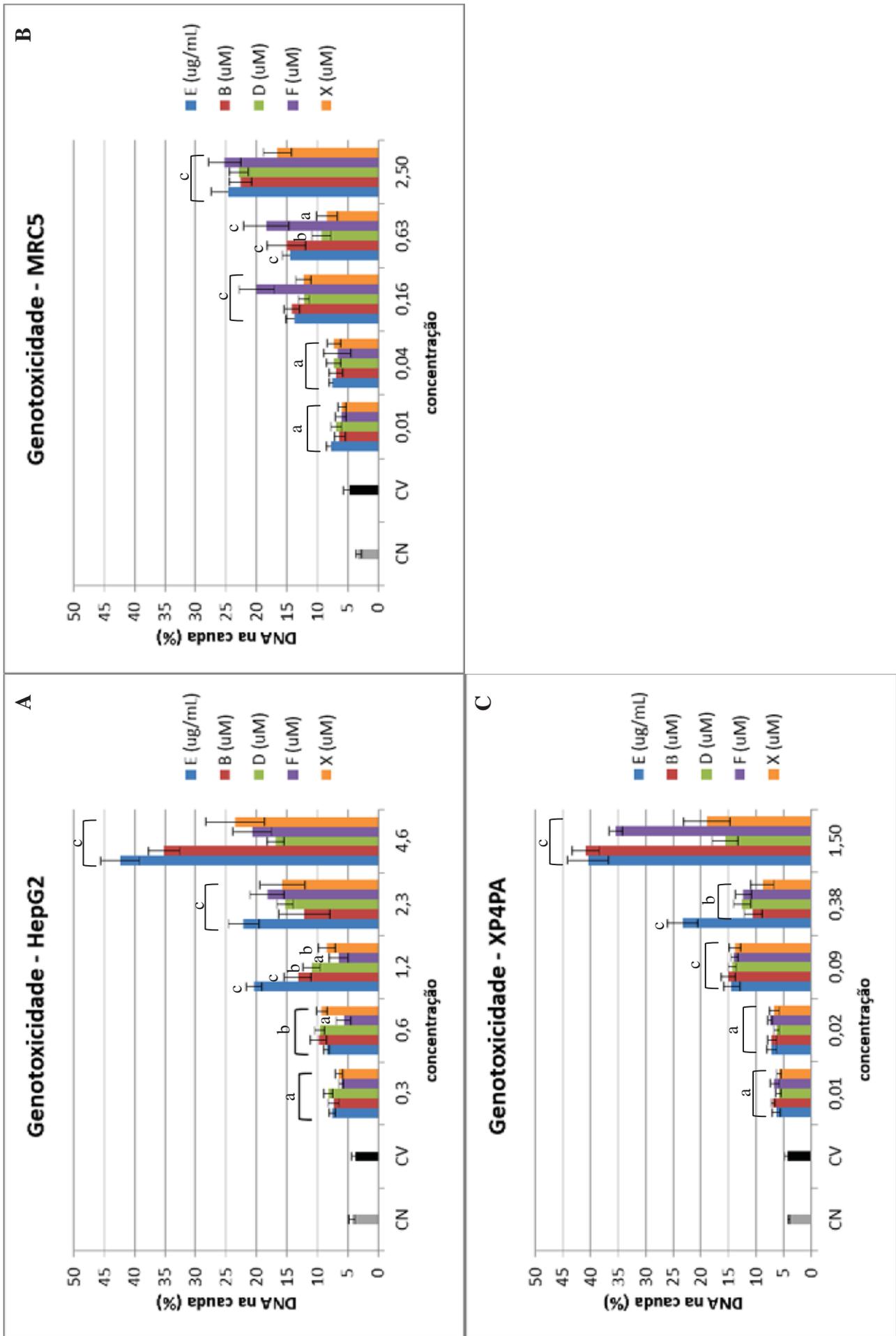


Figura 7: Genotoxicidade dos produtos naturais de *C. sylvestris* pelo ensaio do cometa – tratamento de 24 h e incubação com enzima FPG. A) células HepG2; B) células MRC5; C) células XP4PA. E = extrato etanólico, B = casearina B, D = casearina D, F = caseargreivina F, X = casearina X, CN = controle negativo (células não tratadas, mantidas com DMEM); CV = controle de veículo (DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM). <sup>a</sup>p<0,05; <sup>b</sup>p<0,01 e <sup>c</sup>p<0,001. Kruskal-Wallis pós-teste Dunn comparado com CV.

### 5.3. Ensaio de antigenotoxicidade dos produtos naturais extraídos de *C. sylvestris*

Os ensaios de antigenotoxicidade foram realizados a fim de verificar a possível atividade protetora dos produtos naturais de *C. sylvestris* frente a mutágenos específicos. As concentrações dos produtos naturais de *C. sylvestris* foram escolhidas a partir dos resultados de genotoxicidade e citotoxicidade, e foram analisadas concentrações inferiores às que mostraram baixa resposta genotóxica e citotóxica. Para esse trabalho, foram utilizados os mutágenos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HepG2) e UVC (MRC5 e XP4PA). Dessa forma, as células foram pré e pós-tratadas com os produtos naturais frente aos mutágenos. No caso do controle positivo foi realizado pré ou pós-tratamento com DMEM frente aos mutágenos. Já o controle de veículo tinha por objetivo verificar se a concentração máxima de veículo com mutágeno (DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM) em que os produtos naturais estavam diluídos e que foi utilizada no ensaio, não interferia na resposta antigenotóxica. Portanto, para o controle de veículo as linhagens foram pré ou pós-tratadas com DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM frente aos mutágenos. Como controle negativo as células foram tratadas somente com DMEM que é o meio de cultura de crescimento das células.

Na figura 8 estão demonstrados os experimentos de antigenotoxicidade com pré e pós-tratamento dos produtos naturais de *C. sylvestris* na linhagem HepG2 frente ao mutágeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM), assim como a porcentagem de inibição dos produtos naturais frente aos danos. Pode-se observar um efeito concentração-resposta dos produtos naturais, sendo que os produtos naturais que apresentaram inibição forte (>60%) foram o extrato etanólico a partir de 0,08 µg/mL e a casearina D a partir de 0,15 µM, enquanto que a casearina B apresentou inibição moderada (entre 40 e 60%) na concentração de 0,3 µM. Já no pós-tratamento foram observadas inibição forte pelas casearinas B e D, e moderada pela casearina X e caseargrewiina F.

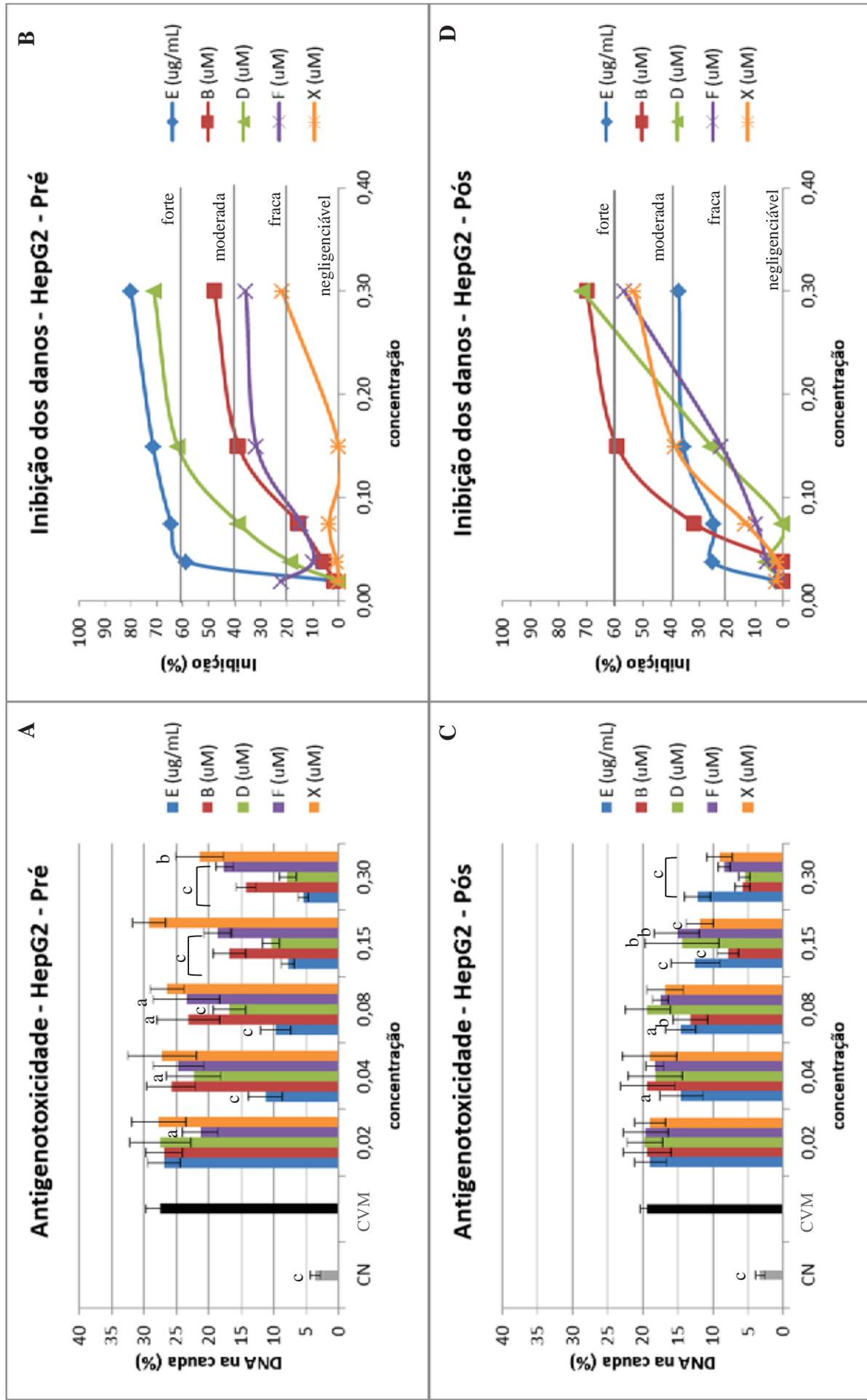


Figura 8: Antigenotoxicidade dos produtos naturais de *C. sylvestris* em células HepG2. A) Pré-tratamento de 24 h com os produtos naturais, seguido de 5 min de exposição com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM); B) Percentagem de inibição dos danos ao DNA relativo ao tratamento descrito em A. C) Pós-tratamento de 24 h das células com os produtos naturais após exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) por 5 minutos. D) Percentagem de inibição dos danos ao DNA referente ao tratamento descrito em C. E = extrato etanólico, B = casearina B, D = casearina D, F = caseargreivina F, X = caseargreivina X, CN = controle negativo (células não tratadas, mantidas com DMEM); CVM = controle de veículo com mutágeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) e pré ou pós-tratamento com DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM). <sup>a</sup>p<0,05; <sup>b</sup>p<0,01 e <sup>c</sup>p<0,001. Kruskal-Wallis pós-teste Dunn comparado com CVM.

Os experimentos de antigenotoxicidade com as linhagens MRC5 e XP4PA foram realizados com e sem incubação dos produtos naturais com o pool de enzimas microssomais S9 para verificar se a metabolização dos mesmos poderia alterar o possível efeito protetor de danos ao DNA. Uma vez que a linhagem HepG2 naturalmente expressa enzimas metabolizadoras, o *pool* de S9 não foi utilizado para a mesma.

Nas figuras 9 e 10 estão demonstrados os experimentos de antigenotoxicidade com pré e pós-tratamento dos produtos naturais de *C. sylvestris* na linhagem MRC5 frente ao mutágeno UVC (26,45 J/m<sup>2</sup>), com e sem a incubação por S9. De forma geral é possível notar que não houve diferença na inibição dos danos ao DNA, induzidos pelo UVC, pelos produtos naturais incubados e não incubados com S9. O único produto natural que apresentou inibição moderada (entre 40 e 60%) tanto no pré como no pós tratamento sem incubação com S9 e no pós-tratamento com incubação com S9 foi a casearina B na concentração de 0,04 µM. Os demais produtos naturais apresentaram inibição fraca (entre 20 e 40%) ou negligenciável (de 0 a 20%).

Já na linhagem XP4PA, (Figuras 11 e 12) o produto natural que apresentou maior inibição frente ao mutágeno UVC (3,59 J/m<sup>2</sup>) foi a caseargrewiina F, sendo que esta foi no máximo fraca (20%), enquanto que os outros produtos naturais apresentaram inibição negligenciável dos danos. Ainda, não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos com e sem incubação com S9.

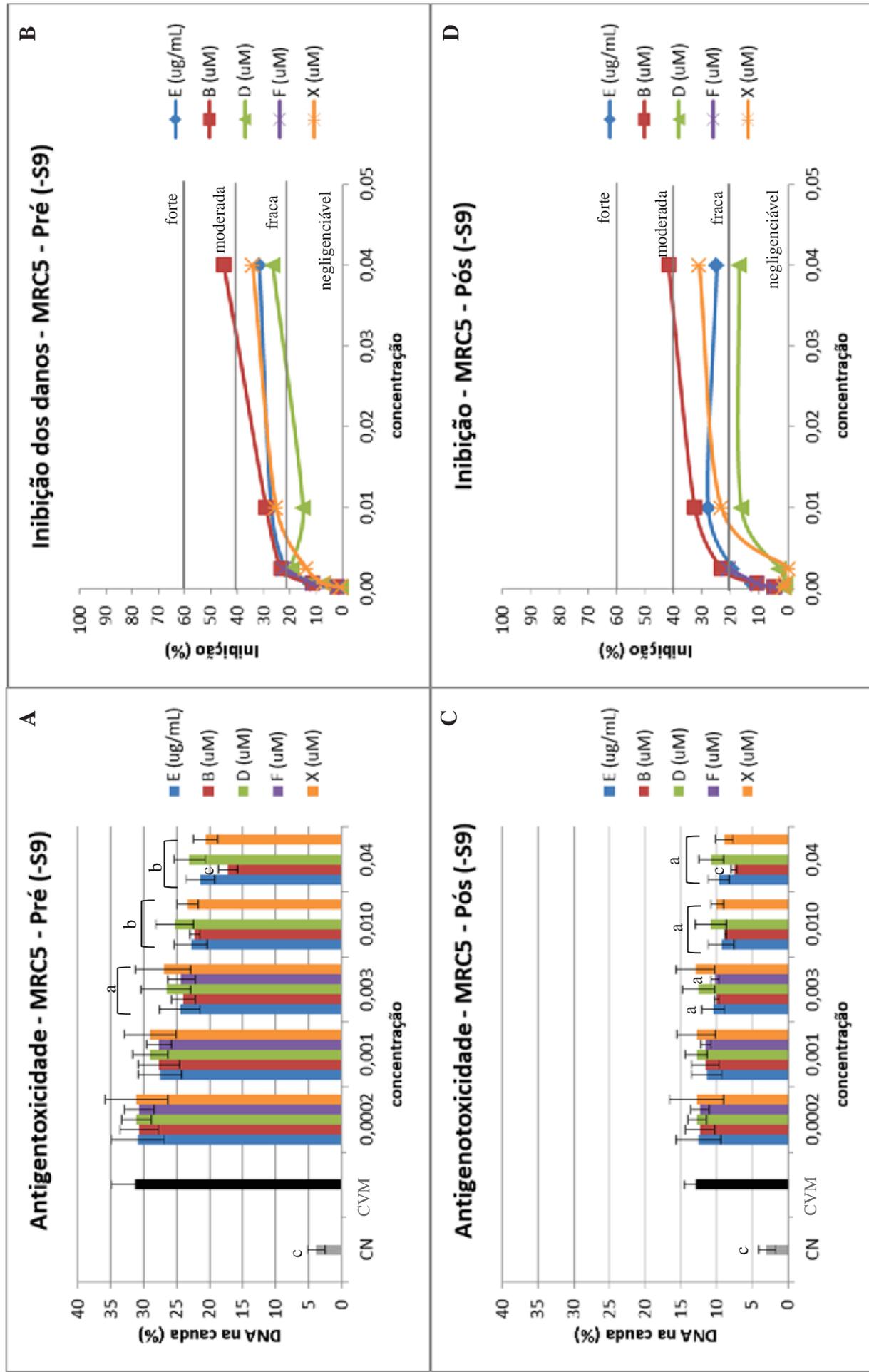


Figura 9: Antigenotoxicidade dos produtos naturais de *C. sylvestris* em células MRC5 sem incubação com S9. A) Pré-tratamento de 24 h com os produtos naturais, seguido de UVC (26,45 J/m<sup>2</sup>). B) Percentagem de inibição dos danos ao DNA referente ao tratamento descrito em A. C) Pós-tratamento de 24 h das células com os produtos naturais após UVC (26,45 J/m<sup>2</sup>). D) Percentagem de inibição dos danos ao DNA referente ao tratamento descrito em C. E = extrato etanólico, B = casearina D, F = casearína D, F = casearína X, X = casearina X, CN = controle negativo (células não tratadas, mantidas com DMEM); CVM = controle de veículo com mutágeno (UVC (26,45 J/m<sup>2</sup>) e pré ou pós-tratamento com DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM). <sup>a</sup>p<0,05; <sup>b</sup>p<0,01 e <sup>c</sup>p<0,001. Kruskal-Wallis pós-teste Dunn comparado com CVM.

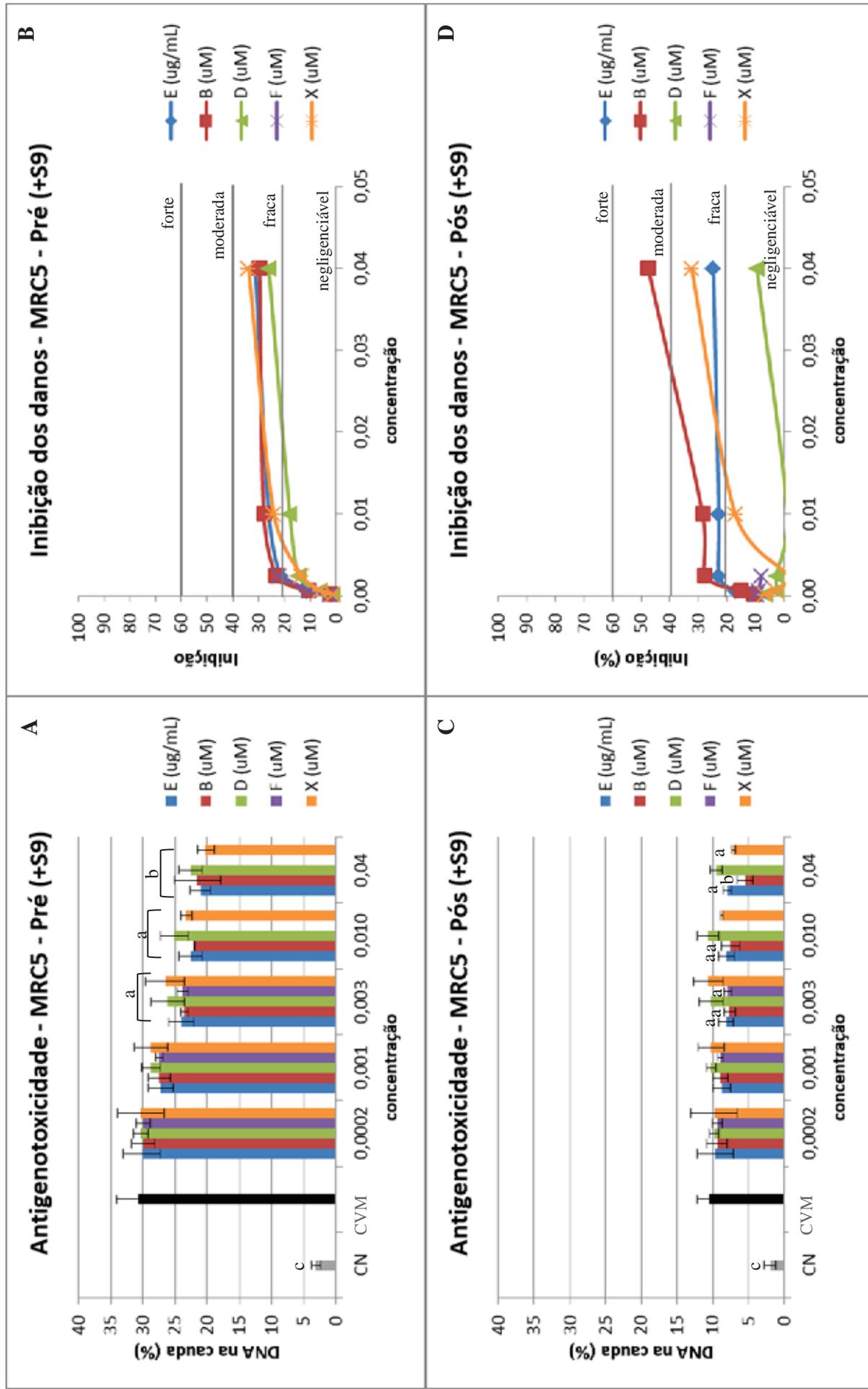


Figura 10: Antigenotoxicidade dos produtos naturais de *C. sylvestris* em células MRC5 com incubação com S9. A) Pré-tratamento de 24 h com os produtos naturais, seguido de UVC (26,45 J/m<sup>2</sup>). B) Porcentagem de inibição dos danos ao DNA referente ao tratamento descrito em A. C) Pós-tratamento de 24 h das células com os produtos naturais após UVC (26,45 J/m<sup>2</sup>). D) Porcentagem de inibição dos danos ao DNA referente ao tratamento descrito em C. E = extrato etanólico, B = casearina B, D = casearina D, F = caseargreawina F, X = casearina X, CN = controle negativo (células não tratadas, mantidas com DMEM); CVM = controle de veículo com mutágeno (UVC (26,45 J/m<sup>2</sup>) e pré ou pós-tratamento com DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM). <sup>a</sup>p<0,05; <sup>b</sup>p<0,01 e <sup>c</sup>p<0,001. Kruskal-Wallis pós-teste Dunn comparado com CVM.

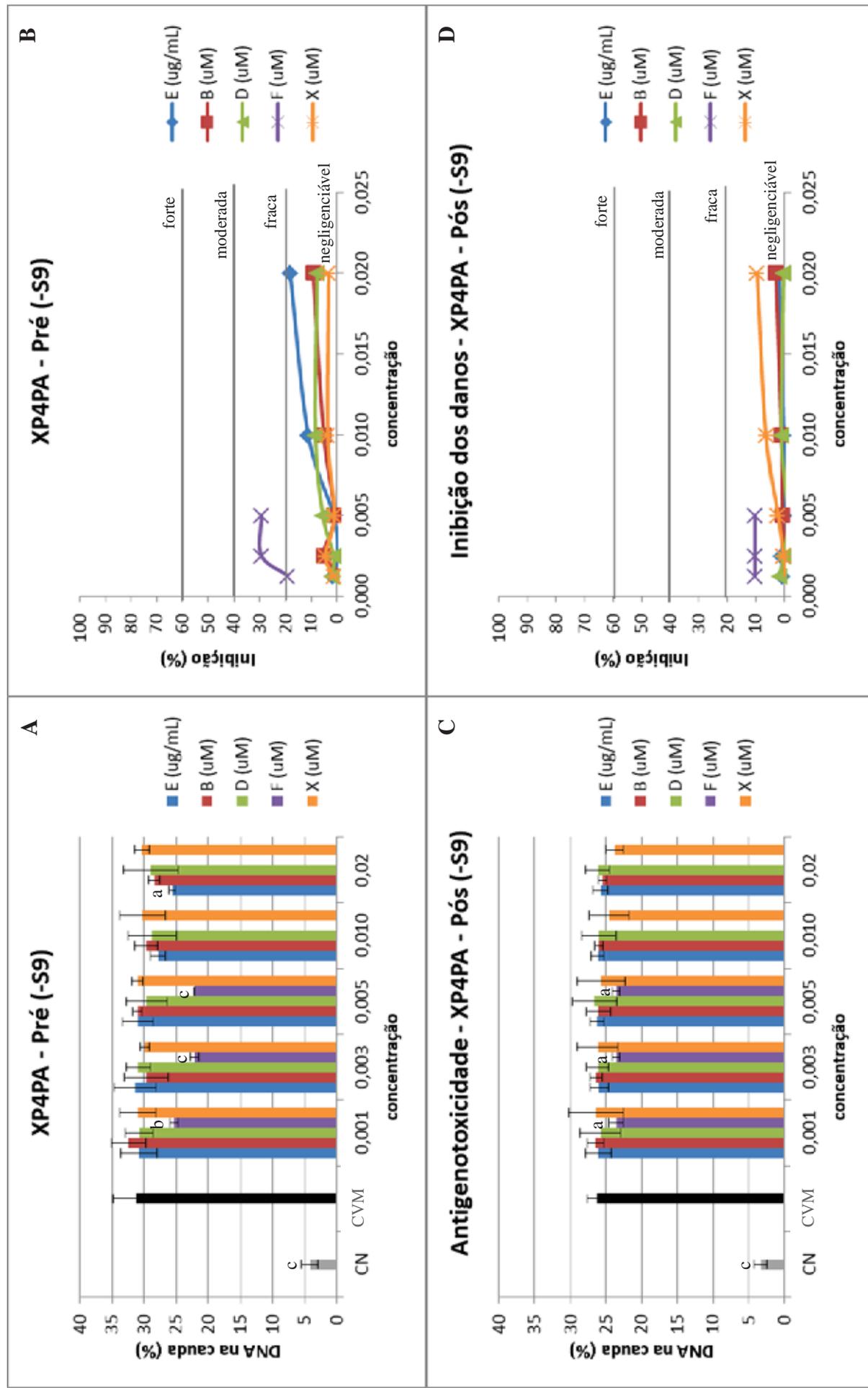


Figura 11: Antigenotoxicidade dos produtos naturais de *C. sylvestris* em células XP4PA sem incubação com S9. A) Pré-tratamento de 24 h com os produtos naturais, seguido de UVC (3,59 J/m<sup>2</sup>). B) Porcentagem de inibição dos danos ao DNA referente ao tratamento descrito em A. C) Pós-tratamento de 24 h das células com os produtos naturais após UVC (3,59 J/m<sup>2</sup>). D) Porcentagem de inibição dos danos ao DNA referente ao tratamento descrito em C. E = extrato etanólico, B = casearina B, D = casearina D, F = caseargreivina F, X = casearina X, CN = controle negativo (células não tratadas, mantidas com DMEM); CVM = controle de veículo com mutágeno (UVC (3,59 J/m<sup>2</sup>) e pré ou pós-tratamento com DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM). <sup>a</sup>p<0,05; <sup>b</sup>p<0,01 e <sup>c</sup>p<0,001. Kruskal-Wallis pós-teste Dunn comparado com CVM.

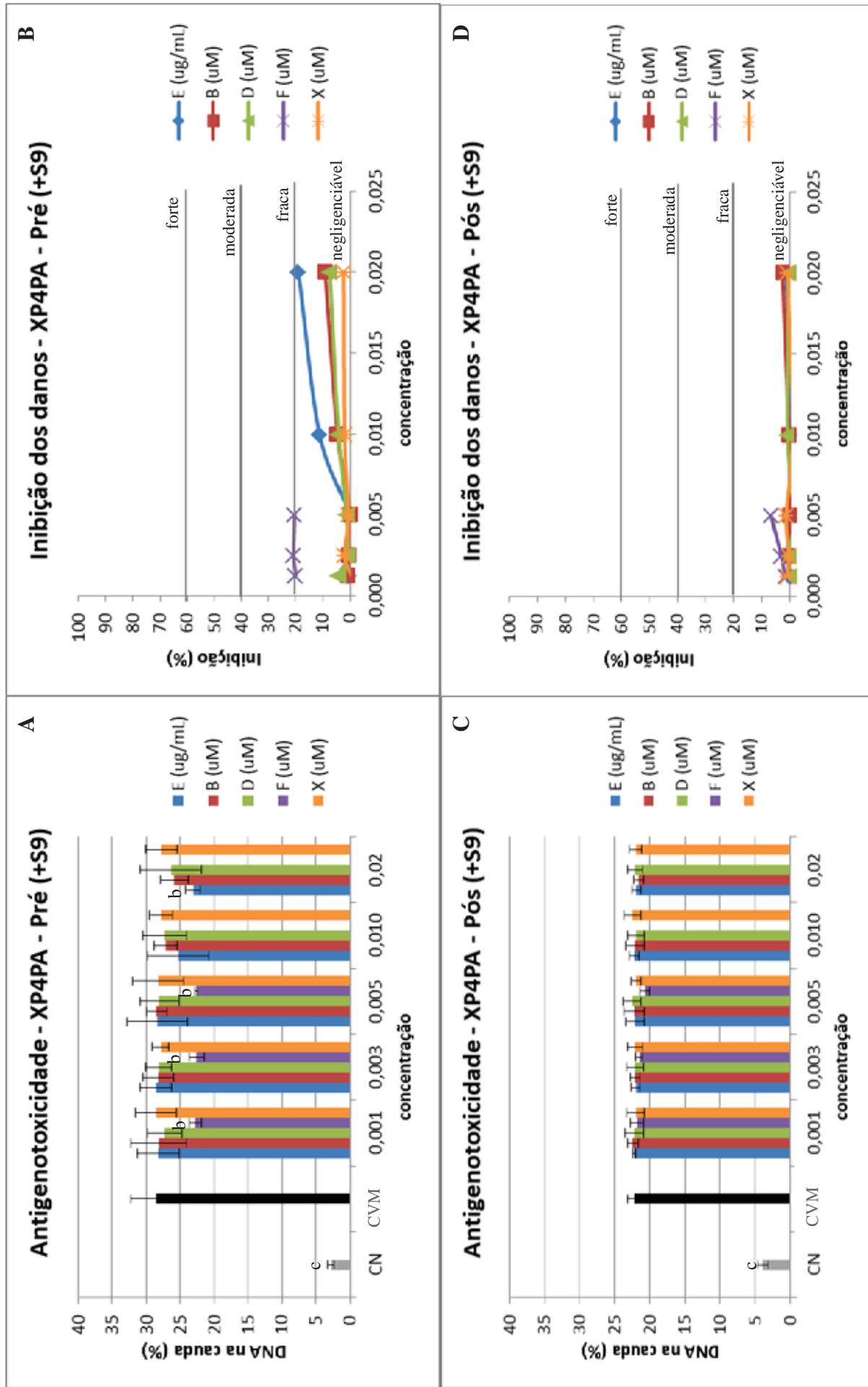


Figura 12: Antigenotoxicidade dos produtos naturais de *C. sylvestris* em células XP4PA com incubação com S9. A) Pré-tratamento de 24 h com os produtos naturais, seguido de UVC (3,59 J/m<sup>2</sup>). B) Porcentagem de inibição dos danos ao DNA referente ao tratamento descrito em A. C) Pós-tratamento de 24 h das células com os produtos naturais após UVC (3,59 J/m<sup>2</sup>). D) Porcentagem de inibição dos danos ao DNA referente ao tratamento descrito em C. E = extrato etanólico, B = caseína D, D = caseína B, F = caseína F, X = caseína X, CN = controle negativo (células não tratadas, mantidas com DMEM); CVM = controle de veículo com DMSO 0,05% e Hanks 2% diluídos em DMEM). <sup>a</sup>p<0,05; <sup>b</sup>p<0,01 e <sup>c</sup>p<0,001. Kruskal-Wallis pós-teste Dunn comparado com CVM.

Na figura 13 estão demonstradas imagens dos nucleóides obtidos no experimento do cometa juntamente com a imagem da análise desses nucleóides pelo programa *Tritek CometScore*<sup>®</sup>.

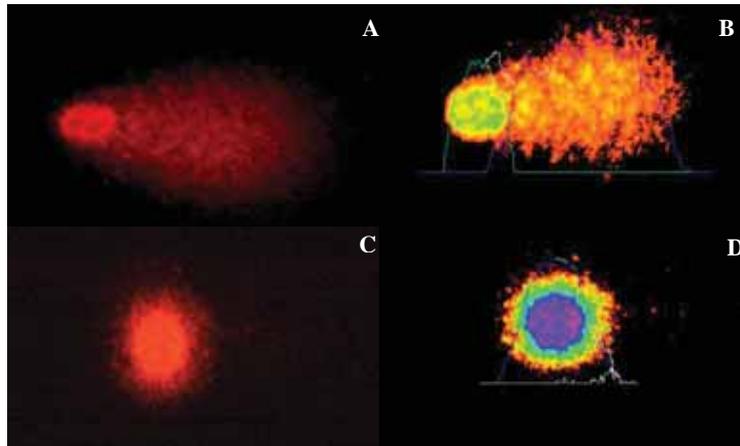


Figura 13: Imagem ilustrativa dos nucleóides obtidos no ensaio do cometa e de sua análise pelo programa *Tritek CometScore*<sup>®</sup>. A) nucleóide obtido do controle positivo de células HepG2 tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) no experimento de antigenotoxicidade. B) Análise de A. C) nucleóide obtido de controle negativo de células MRC5 no experimento de genotoxicidade. D) Análise de C.

#### 5.4. Ensaio de morte celular - Anexina-V-FITC/PI

Os resultados do ensaio de morte celular avaliados por anexinaV-FITC/PI estão demonstrados nas figuras 14 a 16. Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar se os produtos naturais estavam diminuindo a morte por apoptose induzida pelos mutágenos UVC nas linhagens MRC5 e XP4PA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na linhagem HepG2. Para tanto, a concentração dos mutágenos e o tempo em que as células levam para entrar em apoptose foram padronizados previamente, o que permitiu selecionar tratamentos com os mutágenos que levassem em sua grande maioria à morte por apoptose e não por necrose. Neste caso, a resposta dos mutágenos foi acessada após um tempo de recuperação de 24 h, possibilitando utilizar os mutágenos nas mesmas concentrações do ensaio de antigenotoxicidade, e, diminuindo assim, consideravelmente a quantidade de células necróticas. O ensaio de pós-tratamento com os produtos naturais frente aos mutágenos foi realizado para cada linhagem celular, o que permitiu observar uma possível resposta a danos no DNA com ativação de vias de reparo de DNA, que quando eficiente, reduz o número de células apoptóticas.

Na figura 14 estão demonstrados os resultados de morte celular na linhagem HepG2 expostas ao mutágeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) e pós-tratadas com os produtos naturais de *C. sylvestris*. Pode-se observar que para este ensaio houve um aumento significativo de células vivas com relação ao controle de veículo com mutágeno quando as células foram tratadas com os diterpenos clerodânicos na concentração 0,30 µM, com significativa redução no número de células em apoptose precoce (todos p<0,05).

## HepG2

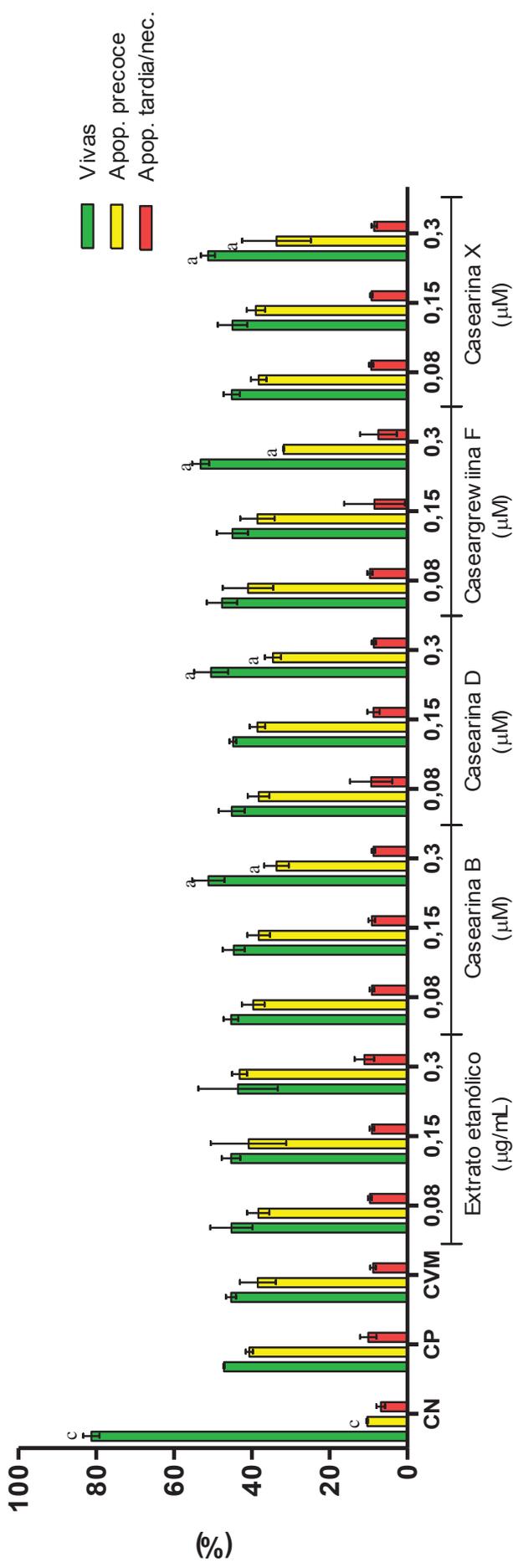


Figura 14: Ensaio de apoptose pelo método da anexina-V – IP em células HepG2 expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) e pós-tratadas 24 h com os produtos naturais de *C. sylvestris*. Apop. precoce = apoptose precoce, Apop. tardia/nec = apoptose tardia ou necrose. One-way ANOVA pós-teste Dunnett para comparação entre o controle de veículo com mutágeno e os grupos teste. <sup>a</sup> p<0,05; <sup>b</sup> p<0,01; <sup>c</sup> p<0,001.

A figura 15 demonstra os resultados do ensaio de morte celular na linhagem MRC5 exposta ao mutágeno UVC (26,5 J/m<sup>2</sup>) e pós-tratada com os produtos naturais de *C. sylvestris*. Observa-se que para o produto natural casearina B (0,04 µM), houve uma diminuição significativa no número de células apoptóticas e, concomitantemente, um aumento na quantidade de células vivas quando comparado ao controle de veículo com mutágeno (p<0,05).

## MRC5

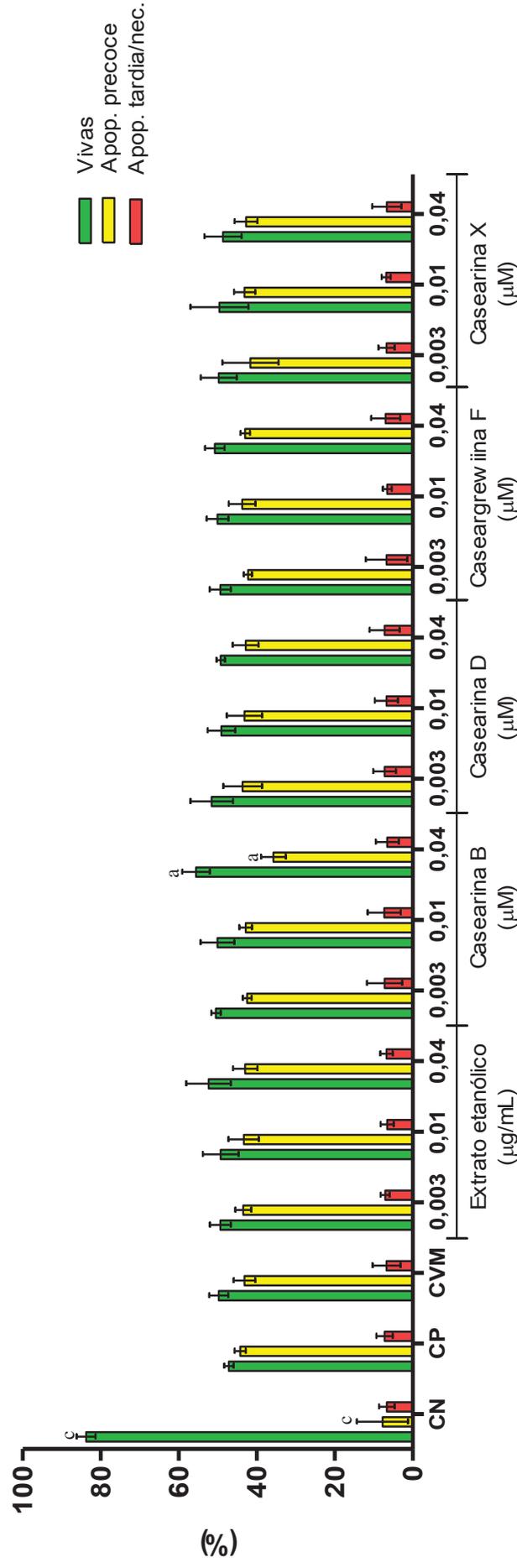


Figura 15: Ensaio de apoptose pelo método da anexina-V-IP em células MRC5 expostas ao UVC (26,5 J/m<sup>2</sup>) e pós-tratadas com os produtos naturais de *C. sylvestris*. Apop. precoce = apoptose precoce, Apop. tardia/nec = apoptose tardia ou necrose. One-way ANOVA pós-teste Dunnett para comparação entre o controle de veículo com mutágeno e os grupos teste. <sup>a</sup> p<0,05; <sup>b</sup> p<0,01; <sup>c</sup> p<0,001.

Os resultados do ensaio de morte celular na linhagem XP4PA exposta ao mutágeno UVC (3,59 J/m<sup>2</sup>) e pós-tratada com os produtos naturais de *C. sylvestris* estão demonstrados na figura 16. Não foram observadas alterações significativas no perfil de morte celular para nenhum dos produtos naturais em relação ao controle de veículo.

## XP4PA

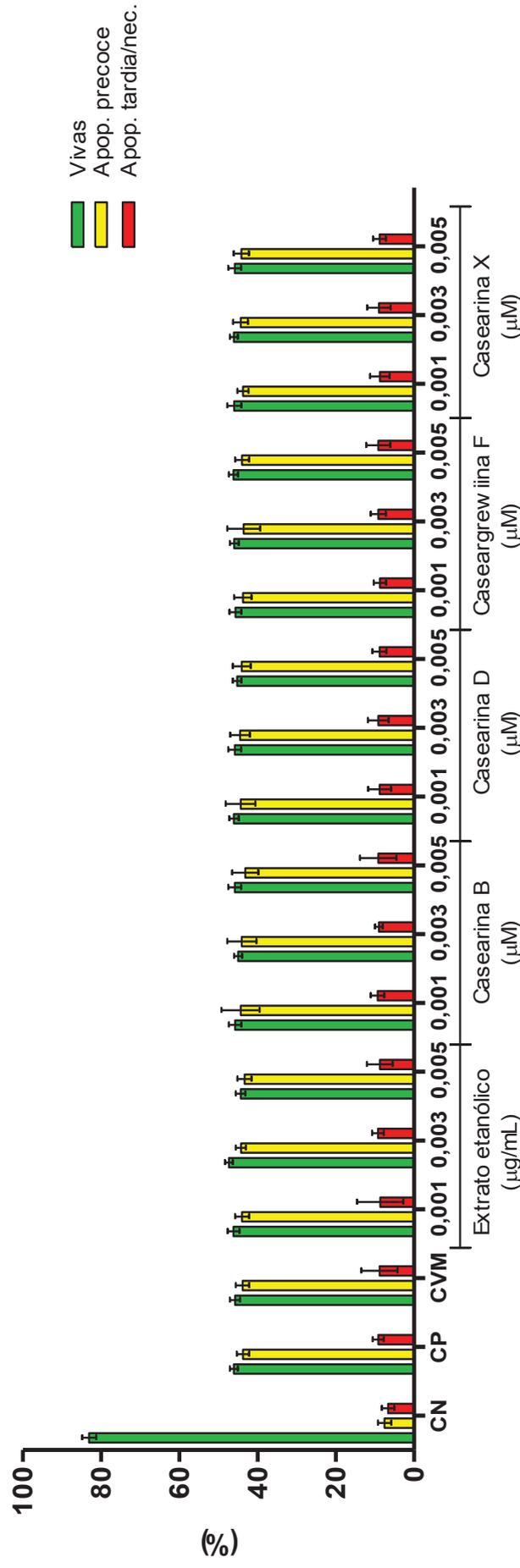


Figura 16: Ensaio de apoptose pelo método da anexina-V-IP em células XP4PA expostas ao UVC (3,59 J/m<sup>2</sup>) e pós tratadas com os produtos naturais de *C. sylvestris*. Apop. precoce = apoptose precoce, Apop. tardia/nec = apoptose tardia ou necrose. One-way ANOVA pós-teste Dunnett para comparação entre o controle de veículo com mutágeno e os grupos teste. <sup>a</sup> p<0,05; <sup>b</sup> p<0,01; <sup>c</sup> p<0,001.

### 5.5. Atividade antioxidante em células HepG2 utilizando DCFDA

Nas figuras 17 a 21 estão demonstrados os resultados do ensaio de atividade antioxidante dos produtos naturais de *C. sylvestris* frente à ROS geradas pelo peróxido de hidrogênio em células HepG2 utilizando-se o DCFDA. Na figura 17 têm-se os resultados para o extrato etanólico. Pode-se observar que o extrato etanólico reduziu significativamente a quantidade de ROS nas duas maiores concentrações (0,08 e 0,15 µg/mL – ambos  $p < 0,05$ ) quando comparado com o controle de veículo com mutágeno (DMEM acrescido de DMSO 0,05% e Hanks 2%, pós-tratado com  $H_2O_2$  1mM). Em comparação com a quercetina, a redução de ROS observada para o extrato etanólico foi baixa.

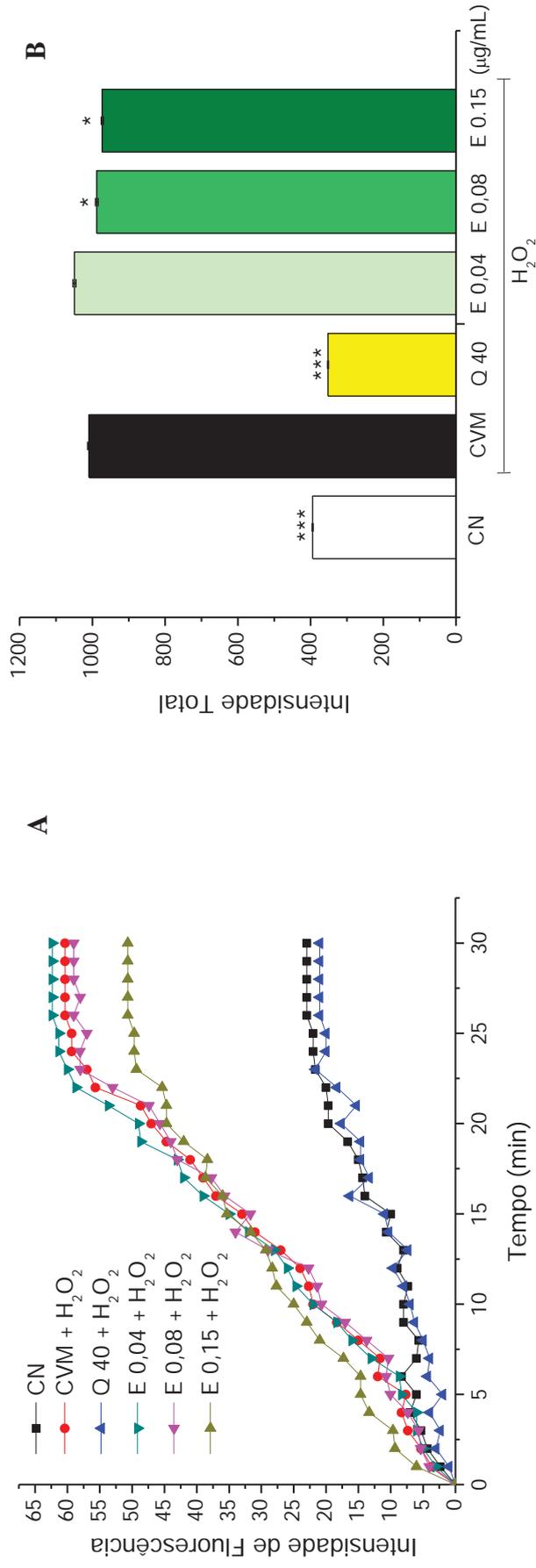


Figura 17: Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com o extrato etanólico de *C. sylvestris* frente às ROS geradas pelo  $H_2O_2$  (1mM) utilizando-se o fluoróforo DCFDA. A) Curva de intensidade de fluorescência total obtida durante 30 min  $\lambda_{excitação} = 485$  nm,  $\lambda_{emissão} = 528$  nm. B) Intensidade de fluorescência total obtida através da integral das curvas demonstradas em A. CN = controle negativo; CVM = controle de veículo com mutágeno (DMEM acrescido de DMSO 0,05% e Hanks 2%); Q = quercetina, E = extrato etanólico. One-way ANOVA pós-teste Dunnett para comparação entre o controle de veículo e os grupos teste. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

A figura 18 demonstra os resultados obtidos para a atividade antioxidante do produto natural casearina B. A casearina B reduziu significativamente a quantidade de ROS produzidas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células HepG2 nas duas maiores concentrações testadas (0,08 e 0,15 µM), respectivamente p<0,05 e p<0,01, quando comparado com o controle de veículo, sendo que comparativamente à quercetina a redução da quantidade de ROS foi baixa.

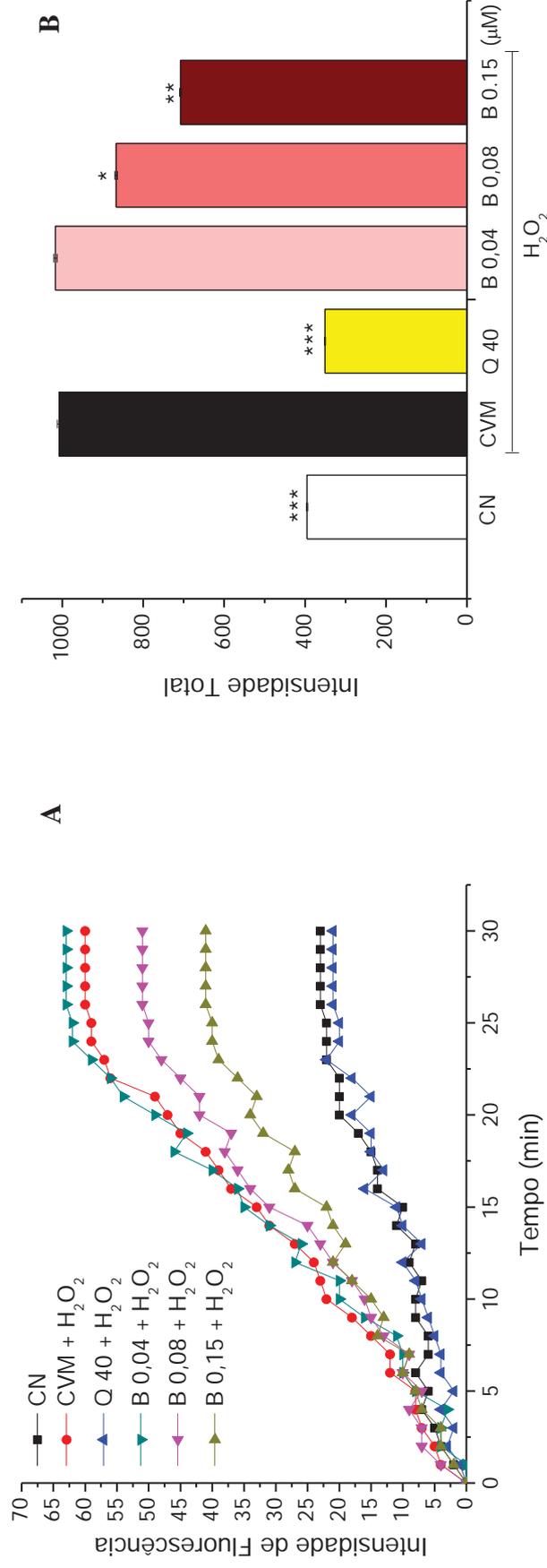


Figura 18: Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com a casearina B frente às ROS geradas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) utilizando-se o fluoróforo DCFDA. A) Curva de intensidade de fluorescência total obtida durante 30 min  $\lambda_{excitação} = 485$  nm,  $\lambda_{emissão} = 528$  nm. B) Intensidade de fluorescência total obtida através da integral das curvas demonstradas em A. CN = controle negativo; CVM = controle de veículo com mutágeno (DMEM acrescido de DMSO 0,05% e Hanks 2%); Q = quercetina; B = casearina B. One-way ANOVA pós-teste Dunnett para comparação entre o controle de veículo com mutágeno e os grupos teste. \*p<0,05; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Os resultados para a atividade antioxidante da casearina D em células HepG2 tratadas 24 h com a substância frente às ROS geradas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estão demonstrados na figura 19. A casearina D não foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de ROS quando comparados os grupos teste com o controle de veículo com mutágeno.

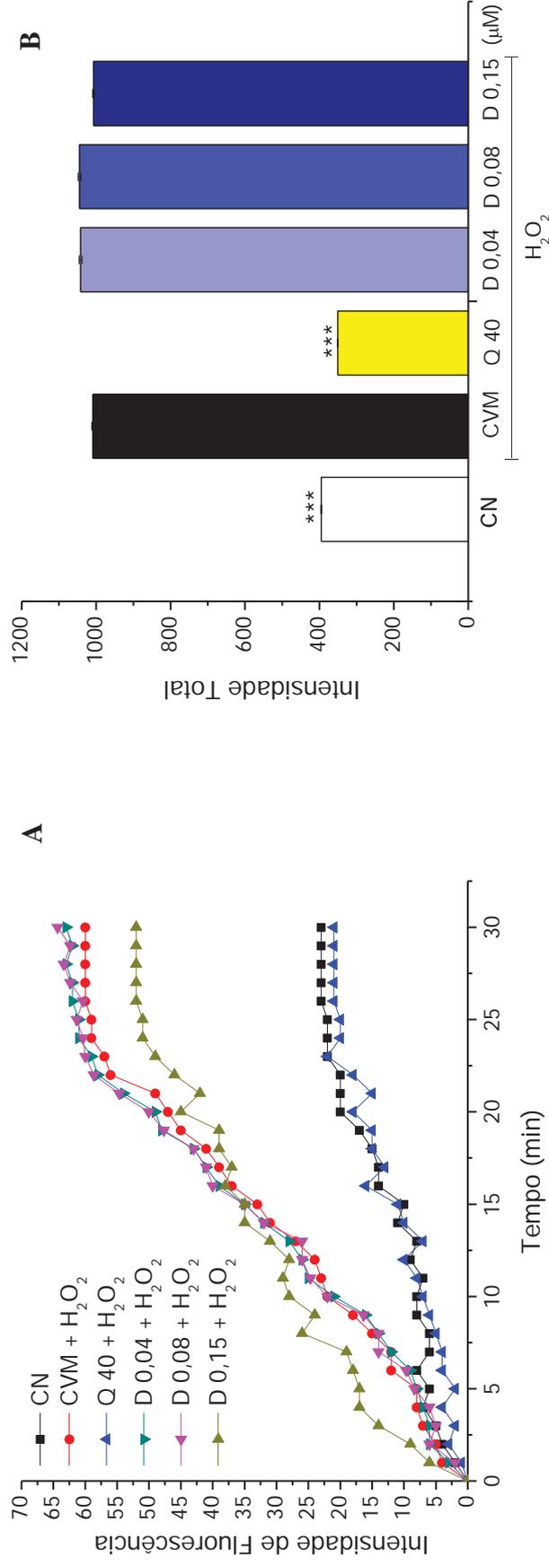


Figura 19: Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com a casearina D frente às ROS geradas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) utilizando-se o fluoróforo DCFDA. A) Curva de intensidade de fluorescência total obtida durante 30 min,  $\lambda_{excitação} = 485$  nm,  $\lambda_{emissão} = 528$  nm. B) Intensidade de fluorescência total obtida através da integral das curvas demonstradas em A. CN = controle negativo; CVM = controle de veículo com mutágeno (DMEM acrescido de DMSO 0,05% e Hanks 2%); Q = quercetina, D = casearina D. *One-way ANOVA* pós-teste Dunnett para comparação entre o controle de veículo com mutágeno e os grupos teste. \*\*\*p<0,001.

Na figura 20 estão demonstrados os resultados da atividade antioxidante da caseargrewiina F nas células HepG2 tratadas por 24 h com o produto natural e expostas ao  $H_2O_2$  para a geração de ROS. Observa-se que a caseargrewiina F reduziu significativamente as quantidades de ROS geradas pelo  $H_2O_2$  na maior concentração testada ( $0,15 \mu M - p < 0,05$ ) e que esta redução não foi tão efetiva como a observada para a quercetina.

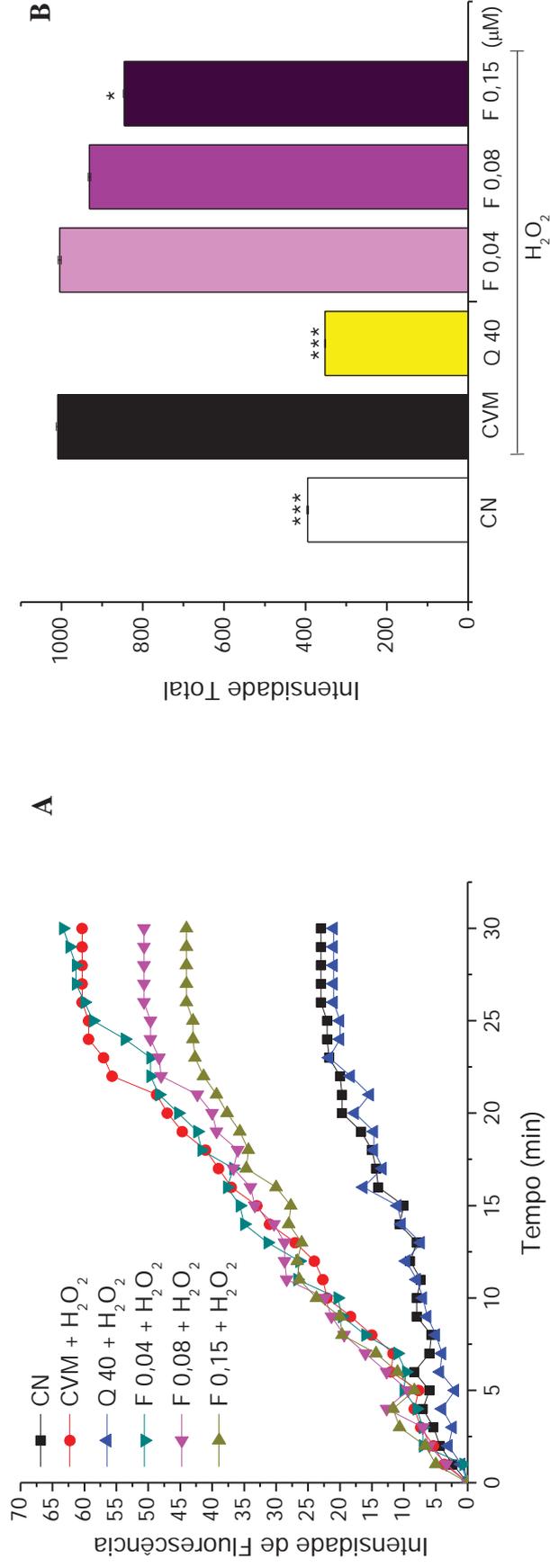


Figura 20: Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com a caseargrewiina F frente às ROS geradas pelo  $H_2O_2$  ( $1 mM$ ) utilizando-se o fluoróforo DCFDA. A) Curva de intensidade de fluorescência total obtida durante 30 min,  $\lambda_{excitação} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{emissão} = 528 \text{ nm}$ . B) Intensidade de fluorescência total obtida através da integral das curvas demonstradas em A. CN = controle negativo; CVM = controle de veículo com mutágeno (DMEM acrescido de DMSO 0,05% e Hanks 2%); Q = quercetina, F = caseargrewiina F. One-way ANOVA pós-teste Dunnett para comparação entre o controle de veículo com mutágeno e os grupos teste. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com a casearina X e exposta posteriormente ao  $H_2O_2$  para a geração de ROS estão demonstrados na figura 21. Houve redução significativa de ROS nas duas maiores concentrações (0,08 e 0,15  $\mu M$ ; ambas  $p < 0,05$ ) quando comparadas ao controle de veículo com mutágeno, entretanto, a redução de ROS não foi tão alta quanto aquela observada para a quercetina.

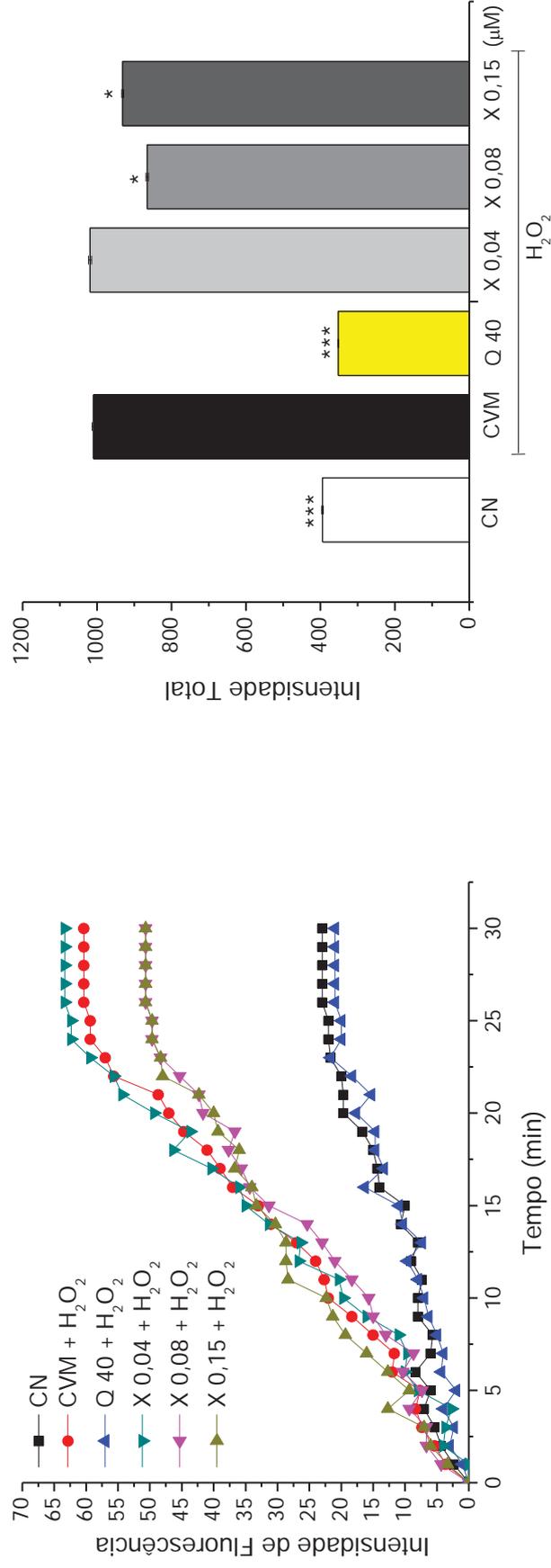


Figura 21: Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular HepG2 tratada por 24 h com a casearina X frente às ROS geradas pelo  $H_2O_2$  (1mM) utilizando-se o fluoróforo DCFDA. A) Curva de intensidade de fluorescência total obtida durante 30 min,  $\lambda_{excitação} = 485$  nm,  $\lambda_{emissão} = 528$  nm. B) Intensidade de fluorescência total obtida através da integral das curvas demonstradas em A. CN = controle negativo; CVM = controle de veículo com mutágeno (DMEM acrescido de DMSO 0,05% e Hanks 2%); Q = quercetina, X = casearina X. One-way ANOVA pós-teste Dunnett para comparação entre o controle de veículo com mutágeno e os grupos teste. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

## 5.6. Ensaio de quinona redutase

A enzima quinona redutase foi avaliada no presente estudo, pois ela é uma enzima de detoxificação que permite verificar se sua ativação está associada a prevenção dos danos de DNA. A tabela 3 mostra os resultados da indução de quinona redutase dos produtos naturais de *C. sylvestris* nas maiores concentrações testadas na linhagem Hepa 1c1c7. Como se pode observar, os produtos naturais não induziram significativamente a enzima quinona redutase, uma vez que um bom indutor de quinona redutase aumenta a expressão da enzima em no mínimo 2 (duas) vezes.

Tabela 3: Ensaio de indução da enzima quinona redutase em células Hepa 1c1c7 tratadas com os produtos naturais de *C. sylvestris* por 48 h.

<b>Produtos naturais</b>	<b>IR ± EP</b>	<b>cv (%) ± EP</b>
<b>β-naftoflavona (0,1 μM)</b>	2,10 ± 0,05	98,90 ± 1,95
<b>Extrato etanólico (0.7 μg/mL)</b>	1,12 ± 0,03	95,36 ± 5,46
<b>Casearina B (0.61 μM)</b>	1,32 ± 0,09	90,74 ± 2,44
<b>Casearina D (0.21 μM)</b>	1,47 ± 0,39	96,12 ± 4,37
<b>Caseargrewiina F (0.09 μM)</b>	1,13 ± 0,01	87,44 ± 3,40
<b>Casearina X (0.44 μM)</b>	1,24 ± 0,13	93,59 ± 8,70

IR: índice de redução da menadiona a menadiol pela enzima quinona redutase; cv (%): porcentagem de células vivas obtida através do ensaio de cristal violeta, EP = erro padrão, β-naftoflavona (0,1 μM) = controle positivo.

## 6. DISCUSSÃO

Trabalhos demonstram que produtos naturais derivados de *C. sylvestris* protegem o DNA de células contra danos causados por diferentes tipos de mutágenos. O óleo essencial da folha apresentou efeito anticlastogênico frente ao mutágeno etilmetanosulfonato quando avaliado pelo método de aberração cromossômica em células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (SOUSA et al., 2007). Já o extrato etanólico das folhas e o diterpeno clerodânico obtido desse extrato, caseargrewiina F, apresentaram efeito antigenotóxico avaliado pelo método do cometa em células sanguíneas de camundongos frente à ciclofosfamida (OLIVEIRA et al., 2009). E, mais recentemente, a casearina X e o extrato etanólico de *C. sylvestris* foram eficazes na proteção de danos ao DNA ocasionados por poluentes extraídos da fuligem da queima de cana-de-açúcar em modelo de *Tradescantia pallida* e camundongos (PRIETO et al., 2012). Entretanto, nenhum desses estudos teve como princípio a elucidação dos mecanismos envolvidos na proteção de danos ao DNA observada. Dessa forma, este trabalho visa enriquecer esses dados, procurando esclarecer mais a fundo estes mecanismos.

Com a finalidade de estudar os mecanismos de proteção aos danos no DNA, foi empregado o método do cometa. No entanto, é recomendado que antes de iniciar um experimento de proteção a danos no DNA por qualquer produto natural, sua citotoxicidade e genotoxicidade sejam avaliadas (ZEIGER, 2007). Dessa forma, foram realizados os ensaios de citotoxicidade de MTT e sobrevivência clonogênica determinando o IC<sub>20</sub> dos produtos naturais e garantindo que eles seriam empregados em concentrações que não fossem prejudiciais à respiração celular (MTT) e à proliferação celular (sobrevivência clonogênica).

Dos resultados de citotoxicidade, pode-se observar que, entre as linhagens, a que apresentou menor citotoxicidade foi a linhagem HepG2, esse fato pode ser explicado por uma possível detoxificação enzimática dos produtos naturais, uma vez que esta linhagem celular é a única descrita como metabolizadora entre as três linhagens observadas.

Ainda, observando a citotoxicidade em cada linhagem específica, avaliada pelo ensaio do MTT (Tabelas 1 e 2), nota-se que para a linhagem HepG2 a substância que apresentou maior citotoxicidade foi a casearina D para 24 h e 48 h, enquanto a caseargrewiina F mostrou-se altamente citotóxica tanto para MRC5 ( $IC_{50} = 0,15 \mu M$ , 24 h) como para XP4PA ( $IC_{50} = 0,90 \mu M$ , 24 h). Um recente estudo avaliou a citotoxicidade desses produtos naturais em diferentes células com tratamento de 24 h também pelo método do MTT, obtendo de forma semelhante uma alta citotoxicidade da caseargrewiina F quando comparada com as demais substâncias estudadas apresentando  $IC_{50} < 0,2 \mu M$ . A partir desses resultados de citotoxicidade observa-se que as casearinas testadas exibiram uma seletividade citotóxica dependendo do tipo celular, o que também foi observado no estudo de Santos et al., 2010. Entretanto, o estudo demonstrou uma citotoxicidade menor dos produtos naturais para a linhagem de fibroblastos L929, já em nosso estudo, a menor citotoxicidade no geral foi observada na linhagem HepG2 como já citado anteriormente (SANTOS et al., 2010).

Quando a citotoxicidade foi avaliada com relação ao efeito tempo-resposta (Tabelas 1 e 2), principalmente nas células XP4PA, o extrato etanólico ( $IC_{50} = 0,21 \mu g/mL$ ; 24h e  $IC_{50} = 0,52 \mu g/mL$ ; 48 h), casearina B ( $IC_{50} = 0,61 \mu M$ ; 24h e  $IC_{50} = 1,40 \mu M$ ; 48 h) e a casearina D ( $IC_{50} = 0,9 \mu M$ ; 24h e  $IC_{50} = 1,30 \mu M$ ; 48 h) foram menos citotóxicos em 48 h do que em 24 h, e, portanto, a citotoxicidade não foi tempo-resposta. Um estudo que verificou a citotoxicidade do fungicida denominado folpet descreveu um padrão resposta de 1-4 h de tratamento, entretanto, o produto apresentou citotoxicidade similar entre os tempos entre

4h e 48 h de tratamento. Os autores se baseiam na hipótese de que o produto natural pode ser degradado e formar um derivado menos tóxico para a célula (CANAL-RAFFIN et al., 2008), e, de fato, este poderia ser um dos fatores que pode ter influenciado nossos achados. Complementarmente, de forma interessante, Santos et al. (2010), relatam que produtos naturais como as casearinas, podem se degradar e formar derivados com função dialdeído que já foram descritos como não citotóxicos para diferentes linhagens celulares. No caso deste estudo, pode ser que, de fato, esses produtos naturais tenham sofrido alguma degradação com o tempo de exposição e, que este produto de degradação não afete de forma tão acentuada a linhagem XP4PA, enquanto que as outras linhagens não apresentam as mesmas características.

Com relação ao ensaio de sobrevivência clonogênica (Tabelas 1 e 2) foi possível observar que os produtos naturais caseargrewiina F, casearina X e casearina B apresentaram atividade anti-proliferativa mesmo nas concentrações onde se observou alta viabilidade celular, avaliada pelo método do MTT. Destaca-se que a caseargrewiina F foi a mais anti-proliferativa dos três produtos naturais citados acima, por apresentar nas linhagens MRC5 e XP4PA (tratadas por 24h), taxa anti-proliferativa de aproximadamente 0,005  $\mu$ M. Uma explicação plausível para esses resultados é que enquanto o ensaio do MTT avalia a viabilidade através da atividade mitocondrial (MOSMANN, 1983), o ensaio de sobrevivência clonogênica avalia a capacidade de divisão celular (BANASIAK et al., 1999). Quando é obtida uma alta taxa de viabilidade, entretanto a sobrevivência clonogênica é baixa, pode-se assumir que a célula ainda possui atividade mitocondrial durante 24 h ou 48 h, mas passado um tempo, que neste estudo foi de 6 dias após o tratamento, poderia haver algum dano na maquinaria de divisão celular. Ainda, sabe-se que dois fatores principais são importantes para a parada da divisão celular. O primeiro seria a lesão do citoesqueleto como descrito para produtos naturais derivados de espiroquetas, que tiveram

atividade citotóxica em células derivadas de carcinoma mamário (MDA-MB-231) por atuarem de forma lesiva para o citoesqueleto das células (BARUN et al., 2005). Outra forma de prejudicar a divisão celular é fazer com que a mesma não entre na fase de mitose (fase M) e de alguma maneira, haja uma parada da célula na fase G2 do ciclo celular. De fato, há estudos que comprovam que a atividade anti-proliferativa de alguns produtos naturais, como é o caso da quercetina, está relacionada com esse mecanismo de ação devido à capacidade desse produto natural em diminuir a expressão de ciclina B (LEE et al., 2006).

Ainda com relação à citotoxicidade ressalta-se que o extrato etanólico muitas vezes demonstrou capacidade de induzir a proliferação celular em todas as linhagens, apresentando porcentagem de sobrevivência maior do que a viabilidade obtida no MTT nas mesmas concentrações (Tabelas 1 e 2). Isso ocorre porque a célula também pode ter sua atividade mitocondrial lesada por algum tempo, e em seguida, recuperar essa atividade e conseqüentemente as células voltarem a se multiplicar. Dessa forma, o MTT demonstra muitas vezes ser ineficaz em avaliar a capacidade citostática de produtos naturais (HATOK et al., 2009).

Segundo proposto por Tice et al. (2000), a genotoxicidade deve ser avaliada abaixo do IC<sub>20</sub>. Porém, foi observado ao utilizar a enzima FPG no ensaio de genotoxicidade, que concentrações que não tinham se mostrado citotóxicas, apresentaram genotoxicidade (Figura 7). Dessa forma, os produtos naturais de *C. sylvestris* por si só causam danos oxidativos ao DNA com um perfil de concentração-resposta como pode ser observado na figura 7. Apesar deste mecanismo não ter sido elucidado para as moléculas desse estudo, Carvalho et al (1998) demonstraram que diterpenos clerodânicos de *C. sylvestris*, conhecidos por casearinas S e T causavam acetilação da molécula de DNA, quando avaliados pelo método de detecção de danos ao DNA em células mutantes de

*Saccharomyces cerevisiae*. Portanto, esta interação das moléculas de casearinas com o DNA pode estar associada ao efeito genotóxico observado nesse estudo. Ainda, especificamente com relação à casearina X, Ferreira et al (2010) descrevem que o produto natural apresenta elevada toxicidade celular em linhagens de leucemia em concentrações acima de 3  $\mu$ M, sugerindo um elevado número de células em apoptose tardia, o que eleva a fragmentação do DNA. Com base nos resultados demonstrados na figura 7, nota-se que de fato, há um aumento considerável nos danos de DNA em concentrações acima de 3  $\mu$ M para a casearina X.

Nos experimentos de antígenotoxicidade foram utilizados os mutágenos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HepG2), e UVC (MRC5 e XP4PA), dessa forma, foi avaliada a proteção a danos oxidativos e fotolesões. Devido aos resultados de genotoxicidade, neste trabalho foram expostos os resultados em concentrações de baixa ou nula genotoxicidade e citotoxicidade como recomendado por Tice et al. (2000).

Com relação aos experimentos com a linhagem HepG2, foi possível observar proteção forte aos danos oxidativos induzidos no DNA através do método do cometa no pré-tratamento com extrato etanólico e casearina D nas maiores concentrações, e, pós-tratamento com as casearinas B e D também nas maiores concentrações. Para os experimentos realizados com as linhagens MRC5 e XP4PA o objetivo foi avaliar a possível ativação de NER pelos produtos naturais. Portanto, a linhagem MRC5 é totalmente proficiente em NER e a XP4PA é defectiva na proteína XPC responsável por reconhecer as fotolesões, possibilitando avaliar se a resposta protetora está relacionada com a maquinaria molecular de NER. Nos experimentos de antígenotoxicidade com a linhagem MRC5 foi observada no máximo inibição moderada pela casearina B enquanto que, na linhagem XP4PA a proteção foi fraca e, na maioria das vezes, negligenciável. Ainda, não

se observou diferença significativa na resposta dos produtos naturais com e sem metabolização pelo pool de enzimas S9.

Quando analisados em conjunto, os dados de genotoxicidade a antigenotoxicidade demonstram-se interessantes e corroboram com resultados prévios obtidos em modelo animal para produtos naturais de *C. sylvestris*, em que foi possível observar no ensaio do cometa concomitantemente uma resposta genotóxica e atividade antigenotóxica significativas (OLIVEIRA et al., 2009). Adicionalmente, outros estudos descrevem o mesmo perfil para produtos naturais derivados de produtos naturais (MIYAJI et al., 2004). Especificamente com relação aos derivados de *C. sylvestris* o fato de uma possível acetilação do DNA que gera uma resposta genotóxica, pode também ser responsável pela acetilação de histonas. A acetilação das histonas faz com que as mesmas se desliguem do DNA resultando em um relaxamento da molécula, dessa forma, o DNA se torna mais acessível à maquinaria transcricional (STERNER e BERGER, 2000). De fato, a acetilação de histonas mostra-se um mecanismo importante, uma vez que faz parte do processo que precede o reparo de DNA, ocorrendo inclusive, frente a danos provocados por UV (RAMANATHAN e SMERDON, 1986). Portanto, possibilitando a correção das lesões tanto pelo mecanismo de reparo de DNA, como pela transcrição de enzimas detoxificadoras em resposta aos danos induzidos (LI et al., 2007), e não necessariamente aumentando a expressão dessas proteínas. Isso sugere porque neste trabalho, para alguns produtos naturais foi observada tanto resposta desmutagênica como bioantimutagênica, independente do dano gerado (oxidativo ou fotolesão). Ainda, justifica porque no modelo animal, segundo Oliveira et al (2009), observaram proteção aos danos induzidos pela ciclofosfamida e Prieto et al (2012) observaram proteção frente aos danos causados por derivados de poluentes da queima da cana-de-açúcar. Essa hipótese, também ajuda a elucidar porque na linhagem XP4PA (defectiva em XPC) foi observada uma resposta

antigenotóxica significativamente menor com relação à linhagem MRC5. Pois na XP4PA mesmo facilitando o acesso de proteínas ao DNA, a principal resposta celular aos danos induzidos por UVC estava prejudicada.

Produtos naturais com esse tipo de perfil são conhecidos na literatura como produtos naturais de Janus, uma menção ao deus romano Janus que possuía uma cabeça com duas faces voltadas para direções opostas, fazendo uma analogia à dualidade do perfil ao mesmo tempo genotóxico e antigenotóxico (ZEIGER, 2007).

Com relação aos experimentos de apoptose, para a linhagem HepG2 (Figura 14) foi observado um aumento significativo do número de células vivas com concomitante redução do número de células apoptóticas pelos diterpenos clerodânicos na maior concentração (0,3  $\mu\text{M}$ ). Ainda na linhagem MRC5 (Figura 15), a casearina B apresentou o mesmo perfil citado anteriormente na concentração de 0,04  $\mu\text{M}$ . Entretanto, na linhagem XP4PA (Figura 16) não foram observadas alterações significativas no perfil de morte celular ocasionado pelo UV quando realizado o pós-tratamento com os produtos naturais. Quando são observados os resultados de apoptose juntamente com os resultados de antigenotoxicidade, nota-se que a redução das células apoptóticas e o aumento das células vivas ocorreu com os produtos naturais que apresentaram inibição de danos de moderada a forte, ou seja, acima de 40%. Essa reversão da morte por apoptose observada nas linhagens HepG2 e MRC5 pode ser um indicativo da atuação eficaz do sistema de reparo, pois, quando os danos ao DNA não são reparados, a célula opta por se auto-eliminar através do processo apoptose (MASLOV e VIJG, 2009). Uma vez corrigidos esses danos, menos células morrem por apoptose e há um conseqüente aumento do número de células vivas como observado nos resultados obtidos.

Com relação ao ensaio de atividade antioxidante, observa-se que o único produto natural que não demonstrou inibir significativamente as ROS geradas pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi a

casearina D (Figura 19). Ainda, dentre os outros produtos naturais, o que demonstrou ter um efeito mais acentuado na redução das ROS foi a casearina B na maior concentração testada de 0,15  $\mu\text{M}$  (Figura 18). Entretanto, os produtos naturais não chegaram a reduzir a quantidade de ROS de forma tão acentuada como a quercetina. Outra característica interessante é que a quercetina é consideravelmente menos citotóxica que os diterpenos clerodânicos empregados neste estudo, uma vez que foi possível utilizá-la na concentração de 40  $\mu\text{M}$  sem afetar a viabilidade celular, enquanto que os produtos naturais de *C. sylvestris* necessariamente tiveram que ser utilizados em doses até 500 vezes menos concentradas (0,08  $\mu\text{M}$ ) devido à citotoxicidade. Especificamente com relação aos diterpenos clerodânicos, Dhanasekaran et al (2009) descrevem a capacidade dessas moléculas em induzir enzimas com atividade antioxidante como a superóxido desmutase e a catalase *in vivo*.

Entretanto, neste trabalho, dificilmente a redução observada na quantidade de danos ao DNA ocasionado pela geração de ROS está totalmente ligada à indução de enzimas detoxificadoras, uma vez que a resposta observada pelos produtos naturais foi consideravelmente baixa no experimento de atividade antioxidante. Em comparação com os resultados de atividade antígeno-tóxica e antiapoptótica, os resultados de atividade antioxidante nas células HepG2 reafirmam a hipótese de que os produtos naturais de *C. sylvestris* não atuam em uma via específica de proteção aos danos causados no DNA. Esses resultados podem indicar que os produtos naturais exercem papel de auxiliar, melhorando a eficácia da resposta ao dano no DNA.

Quando se analisa os resultados da casearina D, por exemplo, a mesma mostrou-se eficaz em reduzir os danos no DNA provocados pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  através do ensaio do cometa, e apresentou atividade antiapoptótica, entretanto, não apresentou atividade antioxidante. Dessa forma, esse produto natural de fato, atuou no auxílio da resposta ao dano através

do aumento da eficácia do sistema de reparo de DNA e não pela indução de enzimas detoxificadoras.

Por fim, vale a pena ressaltar que para este estudo não foi possível fazer uma correlação estrutura-atividade entre os produtos naturais. Além de terem sido avaliadas apenas 4 substâncias puras, as mesmas não apresentaram um padrão constante de atividade biológica.

## 7. CONCLUSÕES

- 1) Os resultados de citotoxicidade demonstram que os derivados de *C. sylvestris* são tem efeito negativo sobre a respiração celular (ensaio de MTT) e efeito antiproliferativo (sobrevivência clonogênica) em altas concentrações. Tendo apresentado em geral menor efeito citotóxico na linhagem metabolizadora HepG2
- 2) Os produtos naturais de *C. sylvestris* demonstraram genotoxicidade em concentrações elevadas no tempo de 24 h através do ensaio do cometa utilizando a enzima FPG;
- 3) Os produtos naturais de *C. sylvestris* que demonstraram-se capazes de proteger o DNA contra danos induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pelo UVC. Concomitantemente, observou-se para alguns compostos a redução do número de células apoptóticas, indicando uma atuação efetiva do sistema de reparo de DNA.
- 4) Não houve influência da metabolização dos produtos naturais na resposta ao dano de DNA causado pelo UVC.

- 5) Com exceção da casearina D, os produtos naturais apresentaram atividade antioxidante frente ao  $H_2O_2$  na linhagem HepG2. Porém não com a mesma potência do antioxidante clássico quercetina.
- 6) Os produtos naturais não foram capazes de induzir a enzima quinona redutase significativamente.
- 7) Em linhas gerais foi possível concluir que os derivados de *C. sylvestris* empregados neste trabalho foram capazes de induzir o sistema de reparo de DNA e de atuar como antioxidantes para proteger o DNA contra os danos induzidos pelo  $H_2O_2$  e pelo UVC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. Molecular Biology of the cell. 5<sup>a</sup> ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2008, 1359 p.

ARAÚJO, S.J.; NIGG, E.A.; WOOD, R.D. Strong functional interactions of TFIIH with XPC, XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. **Mol. Cell Biol.**, v. 21, p. 2281–2291, 2001.

BALLAL, N.D.; KUNDABALA, M.; SBHAT, S.; RAO, N.; RAO, B.S.S. A comparative in vitro evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: Root canal irrigants. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, v. 108, p. 633-638, 2009

BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. In: Preventive antiulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 30, p. 185-197, 1990.

BAUER, E; RECKNAGEL, R.; FIEDLER, U.; WOLLWEBER, L.; BOCK, C.; GREULICH, K. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (Comet assay) obeys a Chi-square ( $\chi^2$ ) not a Gaussian distribution, **Mutat. Res.**, v. 398, p. 101–110, 1998.

BARUN, O.; KUMAR, K.; SOMMER, S.; LANGERAK, A.; MAYER, T.U.; MÜLLER O.; WALDMANN H. Natural product-guided synthesis of a spiroacetal collection reveals modulators of tubulin cytoskeleton integrity, **Eur. J. Org. Chem.**, p. 4773–4788, 2005.

BOLZANI, V.S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p. 1683-1688, 1995.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRRES, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A<sub>2</sub>. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127B, p. 21-30, 2000.

BRESTEL, E.P. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. **BBRC**, v. 126(1), p. 482-488, 1985

CALOMME, M.; PIETERS, L.; VLIRTNCK, A; VANDER BERGHE, D. Inhibition of bacterial mutagenesis by citrus flavonoids. **Planta Med.**, v. 62, p. 222-226, 1996.

CAMENISCH, U.; TRAUTLEIN, D.; CLEMENT, F.C.; FEI, J.; LEITENSTORFER, A.; FERRANDO-MAY, E.; NAEGELI, H. Two-stage dynamic DNA quality check by xeroderma pigmentosum group C protein. **EMBO J.**, v. 28, p. 2387–2399, 2009.

CARVALHO, P. R. F.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. G. I.; BOLZANI, V. da S. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CHAN, G.L.; DOETSCH, P.W.; HASELTINE, W.A. Cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts block polymerization by polymerase I. **Biochemistry**, v. 24, 5723-5728, 1985.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 527-605, 1979.

CHASE, M.W.; ZMARTZTY, S.; LLEDÓ, M. D.; WURDACK, K.J.; SWENSEN, S.M.; FAY, M.F. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. **Kew Bulletin**, v. 57, p. 141-181, 2002.

CLEAVER, J.E.; LAM, E.T.; REVET, I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. **Nature Reviews**, v. 10, p. 756-768, 2009.

COHEN, G. .The Fenton reaction, em: R.A. Greenwald (ed.), CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. CRC press, Inc. Boca Raton, Fla, 1985.

CROTEAU, D.L.; BOHR, V.A. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272(41), p. 25409-25412, 1997.

DIETZ, B.M.; KANG, Y.H.; LIU, G.; EGGLEER, A.L.; YAO, P.; CHADWICK, L.R.; PAULI, G.F.; FARNSWORTH, N.R.; MESECAR, A.D.; VAN BREEMEN, R.B.; BOLTON, J.L. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* Inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 18(8), p.1296-1305, 2005.

DHANASEKARAN M, BASKAR AA, IGNACIMUTHU S, AGASTIAN P, DURAI PANDIYAN V. Chemopreventive potential of Epoxy clerodane diterpene from *Tinospora cordifolia* against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. **Invest. New Drugs**, v. 27(4), p. 347-355, 2009.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; HOLTZCLAW, W.D.; COLE, R.N.; ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; YAMAMOTO, M.; TALALAY, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99(18), p. 11908-11913, 2002.

DRONKERT, M.L.; KANAAR, R. Repair of DNA interstrand cross-links. **Mutat. Res.**, v. 486, p. 217–247, 2001.

DUARTE, T.I.; COOKE, M.S.; JONES, G.D.D. Gene expression profiling reveals new protective roles of vitamin C in human skin cells. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 46,

EGGLER, A.L.; LIU, G.; PEZZUTO, J.M.; VAN BREEMEN, R.B.; MESECAR, A.D. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. **Proc. Natl. Acad. Sci.**

FERREIRA, PM.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chem-Bio. Interac.**, v. 188, p. 497–504, 2010.

FRANKIC, T.; SALOBIR, K.; SALOBIR, J. The comparison of in vivo antigenotoxic and antioxidative capacity of two propylene glycol extracts of *Calendula officinalis* (Marigold) and vitamin E in young growing pigs. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, v. 6, p. 688-694, 2009.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. 1995. DNA Repair and Mutagenesis, Washington, DC:ASM Press.698 p.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C; SIEDE, W.; WOOD, R.D.; SCHULTZ, R.A.; ELLENBERGER, T. 2006. DNA Repair and Mutagenesis, 2<sup>a</sup> ed. Washington, DC:ASM Press.1118 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. (Eds.), Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, New York, 1999, pp. 105–245.

HATOK, J; BABUSIKOVA, E.; MATAKOVA, T.; MISTUNA, D.; DOBROTA, D.; RACAY, P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. **Clin. Exp. Med.**, v. 9, p.1–7, 2009.

HOSHINO, J.; PARK, E.-J.; KONDRATYUK, T.P.; MARLER, L.; PEZZUTO, J.M.; BREEMEN, R.B.V.; MO, S.; LI, S.; CUSHMAN, M. Selective Synthesis and Biological Evaluation of Sulfate-Conjugated Resveratrol Metabolites. **J. Med. Chem.**, v. 53(13), p. 5033-5043, 2010.

HOSSEINIMEHR, S.J.; KARAMI, M. Citrus extract modulates genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. **Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 505-509, 2004.

KADA, T. Environmental and biological factors suppressing induction of mutations. **Toxicol. Forum**, v. 6, p. 580-589, 1983.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; BUAYAIRAKSA, M. Cytotoxic Clerodane diterpenoids from Fruits of *Casearia grewiifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1122-1126, 2007.

KING, A.A.; SHAUGHNESSY, D.T.; MURE, K.; LESZCZYNSKA, J.; WARD, W.O.; UMBACH, D.M.; XU, Z.; DUCHARME, D.; TAYLOR, .JA.; DEMARINI, D.M.; KLEIN, C.B. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. **Mutat. Res.**, v. 616(1-2), p. 60-69, 2007.

KING, A.A.; SHAUGHNESSY, D.T.; MURE, K.; LESZCZYNSKA, J.; WARD, W.O.; UMBACH, D.M.; XU, Z.; DUCHARME, D.; TAYLOR, .JA.; DEMARINI, D.M.; KLEIN, C.B. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. **Mutat. Res.**, v. 616(1-2), p. 60-69, 2007.

LEE, J.L.; LIN, C.T.; CHUEH, L.L.; CHANG, C.J. Autocrine/paracrine secreted Frizzled-related protein 2 induces cellular resistance to apoptosis: a possible mechanism of mammary tumorigenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 279(15), p. 14602-14609, 2004.

LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. **Cell**, v. 128, p. 707–719, 2007.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J.C.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of *Casearia sylvestris* extract and V79 cells by the comet assay. **Toxicol. in Vitro**, v. 18, p.337-342, 2004.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M.A.; MANTOVANI, M.S.; JAMAL, C.M.; NATI, N.; PASSOS, T.D.; MATSUMOTO, S.T. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics Mol. Biol.**, v. 33(1), p. 176-181, 2010.

MASLOV, A.Y.; VIJG, J. Genome instability, cancer and aging. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1790(10), p. 963-969, 2009.

MESQUITA, L.M.; PAULA, J.E.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L.S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines J. *Ethnopharm.*, v. 123, p. 439–445, 2009.

MIGUEL, M.B.; NUNES, S.; DANDLEN, S.A.; CAVACO, A.M.; ANTUNES, M.D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food Chem. Toxic.**, v. 48(12), p. 3418-3423, 2010.

MIYAJI, C.K.; JORDAO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; COLUS, I.M.S. Genotoxicity and anti- genotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, p. 108–114, 2004.

MORITA, K.; HARA, M; KADA, T. Studies on natural desmutagens: Screening for vegetable and fruit factor active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from aminoacids. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, p. 1235-1238, 1978.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55–63, 1985.

NAKAJIMA, Y.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 9(4), 2009.

NOLL, D.M.; MASON, T.M.; MILLER, P.S. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. **Chem. Rev.**, v. 106, p. 277–301, 2006.

OLIVEIRA, A.M.; SANTOS, A.G.; SANTOS, R.A.; SANTOS, A.G.; CSIPAK, A.R.; OLIVATO, C.; FREITAS, M.B.; BASSI, C.L.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; TAKAHASHI, C.S.; SOARES, C.P. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. **Mutagenesis**, v. 24 (6), p. 501-506, 2009.

ORBELIES, N.H.; BURGESS, J.P.; NAVARRO, H.A.; PINOS, R.E.; FAIRCHILD, C.R.; PETERSON, R.W.; SOEJARTO, D.D.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; WANI, M.C.; WALL, M.E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*, **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 95-99, 2002.

OTSUKI, Y. Various methods of apoptosis detection. **Acta Histochem. Cytochem.**, v.33(4), 235-241, 2000.

PENG, B.; HODGE, D.R.; THOMAS, S.B.; CHERRY, J.M.; MUNROE, D.J.; POMPEIA, C.; XIAO, W.; FARRAR, W.L. Epigenetic silencing of the human nucleotide excision repair gene, hHR23B, in interleukin-6-responsive multiple myeloma KAS-6/1 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 280(6), p. 4182-4187, 2005.

PETERMANN, A.; MIENE, C.; SCHULZ-RAFFELT, G.; PALIGE, K.; HÖLZER, J.; GLEI, M.; BÖHMER, F.D. GSTT2, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage. **Mol. Nutr. Food. Res.**, v. 53(10), p.1245-1253.

PRIETO, A.M.; SANTOS, AG; CSIPAK, A.R; CALIRI, C.M.; SILVA, IC; ARBEX, M.A.; SILVA, F.S.; MARCHI, M.R.R; CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S., SOARES, C.P. Chemopreventive activity of compounds extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) Sw against DNA damage induced by particulate matter emitted by sugarcane burning near Araraquara, Brazil, *in press*, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 2012.

PROCHASKA, H.J.; SANTAMARIA, A.B. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. **Anal. Biochem.**, v. 169(2), p. 328-336, 1988.

RAMANATHAN, B.; SMERDON, M. J.Changes in nuclear protein acetylation in UV-damaged human cells. **Carcinogenesis**, v. 63, p. 1087–1094, 1986.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. DO Ó.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chem. and Biodiv.**, v. 7 (1), p. 205-215, 2010.

SARAN, M.; BORS, W.; Radical reactions in vivo – an overview. **Radiat. Environ. Biophys.**, v. 29, p. 249-262, 1990.

SCHOENFELDER, T.; PICH, C.T.; GEREMIAS, R.; AVILA, S.; DAMINELLI, E.N.; PEDROSA, R.C.; BETTIOL, J. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. **Fitoterapia**, v.79(6) p. 465-7, 2008.

SERTIÉ, J.A.A.; CARVALHO, J.C.T.; PANIZZA, S., Antiulcer activity of the crude extract from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharm. Biol.**, v. 38, p. 112-119, 2000.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamin-E and vitamin-C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 62, p. 1315S-1321S, 1995.

SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A.K.; CHAAR, J.S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicol.**, v. 52, p. 655–666, 2008.

SILVA, V.V.; ROPKE, C.D.; MIRANDA, D.V. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* on UVB radiation-induced biomarkers involved in carcinogenesis of hairless mouse epidermis. **Cut. Ocular Toxicol.**, v. 28 (2), p. 53-60, 2009.

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

SKANDRANI, I.; BOUBAKER, J.; BOUHLEL, I.; LIMEM, I.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Leaf and root extracts of *Moricandia arvensis* protect against DNA damage in human lymphoblast cell K562 and enhance antioxidant activity. **Environ. Tox. Pharmacol.**, v. 30(1), p 61-67, 2010.

SOUSA, F.G., SCHNEIDER, N.F.Z., MENDES, C. E., DE MOURA, N. F., DENARDIN, R.B.N., MATUO, R., MANTOVANI, M. S. Clastogenic and anticlastogenic effect of the essential oil from *Casearia sylvestris* Swart. **J. Essent. Oil Res.**, v. 19, p. 376-378, 2007.

STERNER, D.E.; BERGER, S.L. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64 (2) 435-459, 2000.

SUGASAWA, K.; AKAGI, J-I.; NISHI, R.; IWAI, S.; HANAOKA, F. Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: Directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. **Mol. Cell.**, v 36, p. 642–653, 2009.

TAYLOR, J.-S.; GARRET, D.S.; COHRS, M.P. Solution-state structure of the Dewar pyrimidone photoproduct of thymidylyl-(3'-5')-thymidine. **Biochemistry**, v. 27, p. 7206-7215, 1988.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35(3), p. 206-221, 2000.

TININIS, A. G. Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração e análise de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw. 2006. 182f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara.

TREGO, K.S.; TURCHI, J.J. Pre-steady-state binding of damaged DNA by XPC-hHR23B reveals a kinetic mechanism for damage discrimination. **Biochemistry**, v. 45, p. 1961–1969, 2006.

ZEGURA, B.; DOBNIK, D.; NIDERL, M.H.; FILIPI, M. Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in *Salmonella typhimurium* TA98 and HepG2 cells. **Environm. Toxicol. and Pharmacol.**, v. 32, p. 296-305, 2011.

ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? **Mutat. Res.**, v. 626(1-2), p. 1-3, 2007.

## **Capítulo 2**

## **ESTÁGIO DE DOUTORADO NO EXTERIOR**

### **APLICAÇÃO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DE QUIMIOPREVENÇÃO *in vivo* E *ex vivo* CONTRA MUTÁGENOS DA FUMAÇA DE CIGARRO**

#### **Aline Miranda Prieto**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

#### **Profa. Dra. Christiane Pienna Soares**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

#### **Prof. Dr. Silvio De Flora**

Universidade de Estudos de Genova – Itália

## RESUMO

O câncer de pulmão é o tipo de câncer que mais mata no mundo, sendo o consumo de cigarro o principal responsável pelo desenvolvimento da doença. Dessa forma, este projeto teve como objetivo entrar em contato com técnicas atuais de avaliação da quimioprevenção dos efeitos deletérios provocados pela fumaça de cigarro. Primeiramente, realizou-se a determinação de adutos de DNA e 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dGuo) em pulmão de camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro. Essa determinação foi feita através de marcação das lesões específicas com  $^{32}\text{P}$  e posterior quantificação das mesmas. Em seguida, realizou-se um projeto com a finalidade de observar a eficácia do *liberação de fármacos* por nanopartículas lipídicas catiônicas de três quimiopreventivos clássicos: NAC, PEITC e resveratrol. Para tanto, utilizou-se a linhagem celular H727, aplicando protocolo de quimioprevenção com pré-tratamento pelos quimiopreventivos sozinhos ou associados às nanopartículas por 24 h e em seguida tratados com o condensado da fumaça de cigarro (CS) por 48 horas. A determinação dos efeitos quimiopreventivos foi feita através dos ensaios do cometa (danos ao DNA) e anexina-V/7-AD (apoptose). Por fim, verificou-se a possível influência do CS em células H727 na expressão da enzima DICER, processadora de microRNAs (miRNAs), através de qPCR. Observou-se que a fumaça de cigarro exerceu um efeito dose-resposta tanto na formação de adutos como de 8-oxo-dGuo no DNA do pulmão de camundongos Swiss, possibilitando o uso desses bioindicadores em trabalhos futuros. Já as nanopartículas foram eficazes em realizar o *liberação de fármacos* dos quimiopreventivos quimiopreventivos influenciando diretamente na resposta dos mesmos em termos de genotoxicidade, antigenotoxicidade e morte celular. Finalmente, o gene DICER sofreu influência direta do CS tendo sua expressão diminuída frente a esse produto natural.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer de pulmão e o fumo de derivados do tabaco

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer no mundo todo. O Instituto Nacional do Cancer dos Estados Unidos (EUA) projetou 160,340 mortes no país por câncer de pulmão em 2012 (NCI, 2012). E, a estimativa de novos casos de câncer de pulmão no Brasil para 2012 é de 27.320, sendo 17.210 homens e 10.110, mulheres; ainda, os números de mortes por este tipo câncer foi de 21.069, sendo 13.293 homens e 7.776 mulheres em 2009 (INCA, 2012). Apesar do número de fumantes estar diminuindo ao longo do tempo (Figura 1), os dados apresentados continuam alarmantes, sendo que, o número de vítimas mulheres vem aumentando, o que certamente, está relacionado com o aumento do consumo de tabaco pelo sexo feminino ao longo dos anos (NCI, 2005)

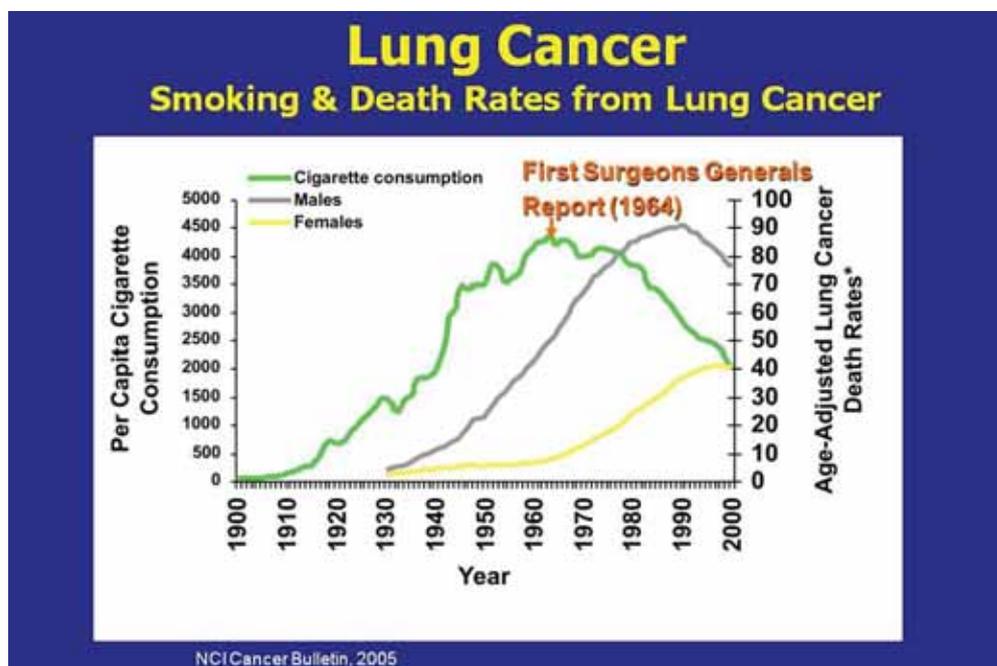


Figura 1: Epidemiologia do câncer de pulmão com relação ao consumo de cigarros nos EUA de 1900 a 2000 (NCI, 2005)

Mais especificamente, o hábito de fumar é o fator de risco principal para o desenvolvimento de câncer de pulmão (U.S. Department of Health and Human Services, 2004 e IARC, 2004). Ainda, o instituto nacional do câncer do Brasil (INCA) cita que 90% dos casos de câncer de pulmão estão relacionados com o fumo de derivados de tabaco (INCA, 2012). Sabe-se que o fumo do tabaco é uma mistura composta por mais de 7000 quimiopreventivos químicos (IARC, 2004 e U.S. Department of Health and Human Services, 2010), a maioria deles, tóxicos. Adicionalmente, dados mostram que pessoas que fumam são de 15 a 30 vezes mais propensas a desenvolver câncer de pulmão ou até mesmo morrer por câncer de pulmão do que aquelas pessoas que não fumam. De fato, estudos mostram que quanto mais tempo se fuma, maior a chance de desenvolver câncer de pulmão (ALBERG et al., 2007; U.S. Department of Health and Human Services, 2004 e IARC, 2004).

Sem dúvida, a melhor forma de evitar o desenvolvimento de câncer de pulmão decorrente do fumo de tabaco é parar de fumar. Entretanto, uma alternativa para aqueles que ainda fumam, seria a aplicação de estratégias quimiopreventivas.

## **1.2. Mecanismos de quimioprevenção**

Sabe-se que o câncer é resultado de um processo de múltiplas etapas, incluindo mecanismos de carcinogênese que envolvem tanto mutagenicidade, morte celular e mecanismos epigenéticos, durante três estágios distintos, porém muito próximos: iniciação, promoção e progressão. Uma vez que reduzir a iniciação ao nível zero é praticamente impossível, a intervenção mais efetiva seria eliminar as células pré-malignas, antes que as mesmas se tornem malignas, aplicando estratégias de quimioprevenção (TROSKO, 2005).

Os mecanismos por trás da quimioprevenção incluem a indução da parada do ciclo celular, indução da apoptose ou inibição da transdução de sinais que levam à mitose.

Ainda, os agentes quimiopreventivos devem ser capazes de diminuir o dano genotóxico, regular a resposta a danos oxidativos e outras formas de stress celular. Adicionalmente, mecanismos epigenéticos de carcinogênese como a metilação do DNA, modificações nas histonas e regulação pós-transcricional por microRNAs podem estar diretamente ligados à quimioprevenção do câncer (KARIKAS, 2010).

Existem evidências epidemiológicas e experimentais que mostram que quimiopreventivos químicos sejam eles sintéticos ou naturais podem inibir de forma positiva o processo de carcinogênese (KARIKAS, 2010), o que torna interessante avaliar o efeito de alguns desses quimiopreventivos frente aos efeitos deletérios provocados pelo fumo de cigarro.

### 1.3. Quimiopreventivos quimiopreventivos

Muitos quimiopreventivos vêm sendo estudados como potenciais agentes quimiopreventivos. Este estudo se focou em três quimiopreventivos que já tem atividades quimiopreventoras descritas na literatura, e que, portanto, podem se mostrar potenciais agentes quimiopreventores frente aos danos causados pela fumaça de cigarro. Estas substâncias são: N-acetilcisteína (NAC), Resveratrol (RES) e o Feniletil-isotiocianato (PEITC) (Figura 2).

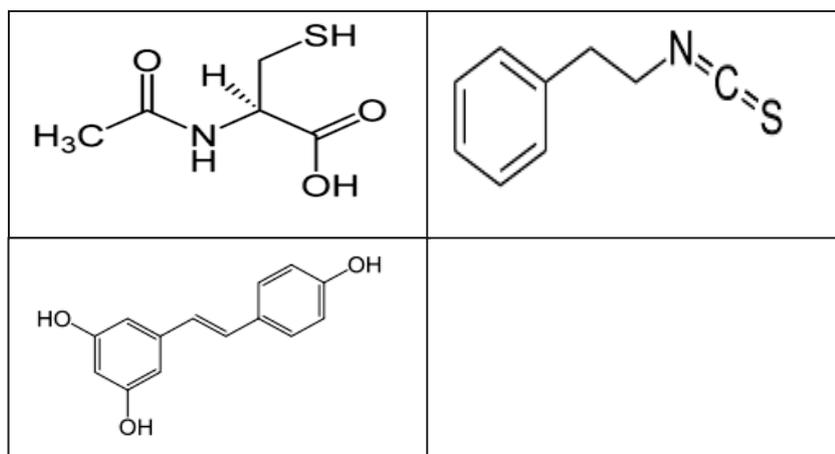


Figura 2: Fórmula estrutural das substâncias utilizadas neste estudo. A) NAC. B) PEITC. C) Resveratrol.

Um estudo recente verificou a atividade quimiopreventiva da N-acetilcisteína sozinha e em combinação com outros quimiopreventivos a fim de regular a proliferação de células bronquiais epiteliais (HBECs) e células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) pré-tratadas com condensado de fumaça de cigarro (CS) (KASSIE et al., 2010). Com relação ao PEITC, pode ser obtido de quimiopreventivos, e, há relatos atuais de atividade quimiopreventiva relacionada à epigenética (HUANG et al., 2011) e controle do ciclo celular induzindo de apoptose em células de câncer de próstata (DU 145) (TANG et al., 2011). Já o resveratrol é um conhecido antioxidante, também derivado de quimiopreventivos, como o vinho. Estudos recentes demonstraram mecanismos de quimioprevenção via regulação de fatores epigenéticos (VANDEN BERGHE, 2012), além de atividade antígenotóxica em células HL-60 (leucemia humana) frente a diversos mutágenos (ABRAHAM et al., 2012).

#### **1.4. Nanopartículas**

Estes quimiopreventivos já são amplamente estudados como quimiopreventivos, entretanto, atualmente, são escassos os estudos que associam esses quimiopreventivos a nanopartículas que facilitem sua biodisponibilidade. Este projeto utilizará nanopartículas lipídicas com grupos catiônicos na superfície, que podem facilmente se ligar a ácidos nucleicos, substâncias hidrofóbicas em sua membrana lipídica, ou substâncias hidrofílicas em seu espaço interno (WU et al., 2011). Dessa forma, estas nanopartículas vem se mostrando importante ferramenta do que se denomina *liberação de fármacos* podendo auxiliar e, melhorar a atividade dos quimiopreventivos.

#### **1.5. O papel do gene DICER no processamento de miRNAs**

A expressão gênica pode ser controlada por pequenos (18-22 nucleotídeos) RNAs não codificadores, os microRNAs (miRNAs), que tem como objetivo a degradação do

mRNA (HE e HANNON, 2004). Nos humanos mais de 1400 sequencias de miRNAs já foram identificadas (Mirbase, 2011), mas atualmente, foram descrito um pequeno número de alvos e funções para as moléculas (PAPADOPOULOS, 2009; Mirecords, 2011). Nos mamíferos, os miRNAs são derivados de transcritos primários longos através do processamento por duas enzimas conhecidas com DROSHA e DICER. Os miRNAs gerados por DICER são incorporados no complexo de silenciamento de RNA que tem como alvo mRNAs homólogos (BERNSTEIN et al., 2003).

O processamento de miRNAs é um importante alvo de estudos para aplicação de futuros mecanismos de quimioprevenção uma vez que, como já citado anteriormente, os miRNAs trabalham no controle pós-transcricional, e, a atividade de alguns tipos de miRNAs está intimamente ligada à progressão de tumores como no caso do câncer de pulmão (SHAHNAZ, 2012). Portanto, torna-se interessante avaliar, a possível influência de CS na regulação da expressão de DICER e indiretamente na atuação frente ao processamento de miRNAs em células do aparelho respiratório.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Entrar em contato com técnicas de análise da quimioprevenção frente aos danos causados pela exposição à fumaça de cigarro em modelo animal e de cultura de células.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Auxiliar na avaliação de biomarcadores intermediários em tecidos de pulmão e cérebro de camundongos Swiss ICR (CD-1<sup>®</sup>) expostos à fumaça de cigarro aplicando a técnica de detecção de aductos de DNA e detecção de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dGuo);

- 2) Avaliar a resposta quimiopreventiva frente ao condensado obtido do fumo de cigarro (CS) utilizando o sistema de *liberação de fármacos* por nanopartículas lipossomais catiônicas dos quimiopreventivos NAC, Resveratrol e PEITC em células H727 através dos ensaios do cometa e anexina-V;
- 3) Auxiliar no experimento de regulação da expressão do gene de DICER por CS em células H727, utilizando as técnicas de transfecção, extração de RNA e qPCR.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Avaliação de biomarcadores intermediários em tecidos de pulmão de camundongos Swiss ICR (CD-1<sup>®</sup>) expostos à fumaça de cigarro**

##### **3.1.1. Exposição dos camundongos à fumaça de cigarro**

Todos os camundongos utilizados no trabalho foram expostos à fumaça de cigarros sem filtro denominados 3R4F que produzem 9.4 mg de tar, 0.73 mg de nicotina, e 12 mg de monóxido de carbono (CO). Posteriormente foi feita uma análise química mais detalhada dos componentes produzidos.

##### **3.1.2. Tratamentos**

Cerca de 12 h depois do nascimento, os camundongos neonatos foram mantidos no mesmo ambiente, e iniciou-se o tratamento como segue, os tratamentos foram conduzidos por 4 semanas.

Grupo A: Controle negativo. Os camundongos foram mantidos em gaiolas dentro de um gabinete com ar filtrado. 4 machos, 8 fêmeas.

Grupo B: Camundongos expostos 1 h/dia à fumaça de cigarro, dentro de um sistema de exposição ao fumo (Teague Enterprises, Davis, CA) (Figura 3). 6 machos, 4 fêmeas.

Grupo C: Camundongos expostos à fumaça de 1 cigarro ao dia. 8 machos, 5 fêmeas.

Grupo D: Camundongos expostos à fumaça de 2 cigarros ao dia. 5 machos, 4 fêmeas.



Figura 3: Sistema de exposição ao fumo Teague Enterprises®

### 3.1.3. Detecção dos adutos de DNA

Adutos DNA lipofílicos são detectados após a extração em butanol e marcação com  $^{32}\text{P}$ . O DNA (60-10 mg) é despolimerizado para monofosfato-3'nucleotídeos por incubação com micrococcal nuclease (DNA 0,14 U / mg) e com fosfodiesterase do baço (1 DNA mU / mg) a 37 ° C por 3,5 h, pH 6.5. Adutos DNA lipofílicos são extraídos da mistura de reação pela adição de um volume (200 L) de butanol saturado em água, que contém o agente de transferência de fase cloreto de amônio tetrabutílica (15 mL). A reação com  $^{32}\text{P}$  relacionado

aos adutos de DNA é catalisada pela quinase T4 polinucleotídeo plasmídeo (8 U) dissolvida em bicina 200 mM, 100 mM ditioneitol, espermidina 10 mM. O pH é ajustado para 9,5. O AT- $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  (64  $\mu\text{Ci}$ , atividade específica  $\geq 6000 \text{ Ci / mmol}$ ) (ICN, Irvine, CA, EUA) é usado como doador de  $^{32}\text{P}$ . A reação é realizada a 24 ° C por 40 min. Os adutos de DNA marcados com  $^{32}\text{P}$  são purificados a partir da mistura de reação por cromatografia em camada fina multidirecional (TLC) na folha de celulose revestidos com o polietilenimina permutador de aniões (Macherey Nagel e, Düren, Alemanha). A detecção desses adutos é feita através de manchas radioativas na folha de cromatografia por autoradiografia eletrônica realizada em um contador digital de gás de cintilação (InstantImager, Packard, MD, EUA). A radioatividade emitida é quantificada como contagens por minuto (cpm). A relação entre cpm detectado em adutos DNA/cpm detectado em nucleotídeos normal (multiplicada pelo fator de diluição) é calculado e relatado como adutos/105 nucleotídeos normais.

#### **3.1.4. Análise da 8-Hidroxi-2'-Deoxiguanosina em células de pulmão de camundongos**

As moléculas de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dGuo) são detectados por acidificação com ácido trifluoro acético, e marcação por  $^{32}\text{P}$ , cromatografia em camada fina monodirecional e autoradiografia eletrônicos. O DNA (1-3 mg) é despolimerizado para 3'nucleotídeos-monofosfato por incubação com micrococcal nuclease (DNA 0,14 U/mg) e fosfodiesterase do baço (1 DNA mU/mg) a 37 ° C por 3,5 h. Nucleotídeos sem modificações são seletivamente removidos por incubação com 80% v/v com ácido trifluoroacético (30  $\mu\text{L}$ ) por 10 min em temperatura ambiente. As amostras são secas por centrifugação a vácuo. Em seguida, as moléculas de 3'-fosfato-8-oxo-dG são marcadas

pela incubação com polinucleotídeo quinase T4 plasmídeo (8 U), dissolvido em bicina 200 mM, 100 mM ditioneitol, espermidina mM, na presença de AT- $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  (64  $\mu\text{Ci}$ , atividade específica  $\geq 750 \text{ Ci / mmol}$ ) (ICN, Irvine, CA, EUA), que é utilizado como doador de  $^{32}\text{P}$ . A reação é realizada a 24 ° C por 40 min. A mistura sofre digestão nuclease P1 (2,7 U a 37°C por 60 min) para remover seletivamente  $^{32}\text{P}$  de nucleotídeos normais . Os  $^{32}\text{P}$  marcados de 8-oxo-dG são purificados a partir da mistura de reação por cromatografia em camada fina monodirecional em uma folha de 18 x 3 centímetros de celulose revestidos com o trocador de anion polyethylenimine (Macherey Nagel e, Düren, Alemanha). O desenvolvimento cromatográfico é realizado em unbuffered ácido fórmico 1,5 M. Sob essas condições  $^{32}\text{P}$ -marcado com 8-oxo-dG migra lentamente na parte central da área cromatográfica, enquanto nucleotídeos normais acumulam na borda superior da folha de cromatografia que é cortada. O  $^{32}\text{P}$ -marcado com 8-oxo-dGuo é identificado por autoradiografia eletrônica e quantificada pelo cálculo RAL, como descrito anteriormente para adutos de DNA. Os resultados são expressos como 8 - oxo-dGuo/105 nucleotídeos.

### **3.2. Quimioprevenção dos danos causados pelo condensado da fumaça de cigarro em células H727 utilizando nanopartículas**

Os ensaios a seguir foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Alberto Izzotti – Departamento de Ciências da Saúde – Universidade de Genova.

#### **3.2.1. Substâncias**

Foram utilizados os seguintes quimiopreventivos: N-acetilcisteína (NAC), Resveratrol (RES) e Feniletil-isotiocianato (PEITC) todos obtidos da empresa Sigma-Aldrich®. Adicionalmente, para verificação dos efeitos do fumo de cigarro nas células foi utilizado um

condensado produzido a partir da fumaça de cigarro (CS), esse condensado foi obtido no próprio laboratório. O produto natural NAC foi solubilizado em PBS na concentração de (12 mM), o RES foi solubilizado na concentração de 104 µg/mL em DMSO, o PEITC também foi solubilizado em DMSO na concentração de 104 µM, já o CS foi solubilizado em DMSO na concentração de 125 mg/mL.

### **3.2.2. Nanopartículas lipossômicas catiônicas**

Os quimiopreventivos tiveram sua atividade avaliada tanto sendo adicionados de forma direta às células, como sendo veiculados em nanopartículas lipossômicas, a fim de verificar uma possível alteração na resposta de quimioprevenção frente às duas diversas formas de exposição das células aos quimiopreventivos. Primeiramente os quimiopreventivos foram diluídos em OptiMEM (Life Technologies®), em seguida, adicionou-se as nanopartículas lipossomais catiônicas (WU et al., 2011) na concentração de 8µg/mL, esta solução foi vortexada por 5 segundos, e incubada a temperatura ambiente (TA) por 15 minutos antes de ser adicionada às células.

### **3.2.3. Cultura de células**

As células H727 (carcinoma bronquial humano) foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v), L-glutamina e bicarbonato de sódio. A cultura foi mantida a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.4. Protocolo de quimioprevenção

Para determinar a possível atividade quimiopreventiva dos quimiopreventivos frente ao CS foi executado o seguinte procedimento: pré-tratamento das células ( $10^5$ /mL) durante 24 horas com os quimiopreventivos, seguido de tratamento de 48 horas com CS. Foram avaliadas 3 concentrações de cada produto natural: NAC (0,75 a 3 mM), RES (0,3 a 1,2  $\mu$ g/mL) e PEITC (1,25 a 5  $\mu$ M), essas concentrações foram determinadas com base nos experimentos de MTT descrito no item 3.5. Em seguida foram realizados os ensaios do cometa e de anexina-V. Em todos os ensaios foram realizados controle negativo (células sem tratamento, mantidas somente com meio de cultura) e controle de veículo (veículo onde foram solubilizadas os tratamentos, ressaltando que a concentração de DMSO não ultrapassou 0,5%, quando utilizadas as nanopartículas, as mesmas foram adicionadas a este controle, no caso de NAC o controle de veículo foi PBS a no máximo 0,5%).

### 3.2.5. Ensaio de MTT

Foi determinada a viabilidade dos quimiopreventivos assim como a resposta de viabilidade dos tratamentos de quimioprevenção. Primeiramente, determinamos o  $IC_{20}$  das nanopartículas (0,3 a 625  $\mu$ g/mL), também determinamos o  $IC_{20}$  do CS (7,8 a 500  $\mu$ g/mL), assim como o  $IC_{20}$  dos quimiopreventivos nas seguintes concentrações: NAC (0,19 a 12 mM), RES (0,3 a 10  $\mu$ g/mL) e PEITC (3,1 a 100  $\mu$ M). Em seguida, o experimento de MTT também foi realizado para o protocolo de quimioprevenção descrito no item 3.4.

Após o tratamento com os quimiopreventivos, o meio de cultura foi removido e o protocolo do MTT foi realizado segundo Mosmann (1983). Inicialmente, 5mg/mL de MTT em PBS foram adicionados em cada poço da microplaca com 96 poços, as células na microplaca foram incubadas a 37°C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos

cristais violeta de formazana. Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 570 nm, com um background de 660 nm, utilizando o equipamento Nanodrop®. A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento.

$$\% \text{ células vivas} = (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do Controle negativo}) \times 100$$

O IC<sub>20</sub> dos quimiopreventivos foi determinado por análise de regressão utilizando o software OriginLab 8.0, já a análise estatística foi realizada utilizando o teste *One-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet comparando-se os tratamentos com controle de veículo utilizando o software GraphPad Prisma 5.0, com significância mínima de  $p < 0,05$ .

### 3.2.6. Ensaio do cometa

Para este teste as células foram tratadas com os quimiopreventivos sozinhos e combinados com as nanopartículas em concentrações abaixo do IC<sub>20</sub> para determinação da genotoxicidade, e, o protocolo de quimioprevenção descrito no item 3.4 foi executado para avaliação da antigenotoxicidade. Cada tratamento foi realizado em duplicata segundo o protocolo previamente estabelecido por Singh et al. (1988). Lâminas limpas pré-tratadas com agarose ponto de fusão normal, receberam uma mistura de agarose baixo ponto de fusão (37°C) juntamente com as células ( $10^4$ ). Posteriormente, foi colocado 100µL entre lâmina e lamínula, após a solidificação, a lamínula foi retirada da lâmina, mergulhando a lâmina em solução de lise, *overnight*. Em seguida, a eletroforese alcalina foi realizada a 4 °C, correndo por 20 minutos. Depois, as lâminas foram lavadas em solução de neutralização, por fim fixadas em etanol absoluto. As lâminas foram coradas com brometo de etídio e lidas em um microscópio de fluorescência com filtro de 516-560 nm em

aumento total de 200X. Foram capturadas imagens de 50 nucleóides por alíquota de células e analisadas pelo software *TriTek CometScore*<sup>®</sup> versão 1.5. O parâmetro adotado no presente estudo foi a porcentagem de DNA na cauda. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn comparando-se os tratamentos com controle de veículo utilizando o software GraphPad Prisma 5.0, com significância mínima de  $p < 0,05$ .

### **3.2.7. Ensaio de morte celular – Anexina-V-APC/7-AD**

Para a verificação do perfil de morte celular dos quimiopreventivos foi realizado o ensaio de anexina-V seguindo o protocolo de quimioprevenção descrito no item 3.4. O princípio do método se baseia no fato de que em células saudáveis, o fosfolípido fosfatidilserina está localizado na face interna da membrana celular, entretanto, frente a um estímulo de morte celular, este fosfolípido é prontamente externalizado. A anexina-V é uma proteína que apresenta elevada atividade anticoagulante dependente de íons  $Ca^{2+}$  e com uma alta afinidade por aminofosfolípidos, ou seja, alta afinidade pela fosfatidilserina. Já o 7-amino-actinomicina D (7-AD) é prontamente transportado para o interior das células que estão em estado avançado de morte, uma vez que estas células tem a integridade de sua membrana citoplasmática prejudicada (OTSUKI, 2000). Portanto, segundo Otsuki (2000), utilizando-se anexina-V conjugada a um fluoróforo e, um corante fluorescente de núcleo, neste caso o 7-AD, é possível distinguir os seguintes tipos celulares: células vivas (baixa concentração de anexina-V e baixa concentração de PI), apoptose precoce (elevada concentração de anexina-V e baixa concentração de 7-AD), apoptose tardia/necrose (elevada concentração de anexina-V e elevada concentração de 7-AD). O sobrenadante das células foi recolhido em tubos de centrifuga de 2 mL, em

seguida, as células foram lavadas com PBS por duas vezes, que também foi recolhido, foram desaderidas com o auxílio de um scraper, as células foram recolhidas e os tubos foram levados para centrifugação a 200 x g por 3 minutos e o sobrenadante foi removido. Posteriormente foi adicionado PBS-EDTA 2  $\mu$ M e incubado a TA por 10 minutos, as células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, o ensaio de apoptose foi executado utilizando-se o kit de Anexina-V/7-AD para detecção de apoptose (BD Biosciences®). As células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão de ligação, foram adicionados 5  $\mu$ L da solução de anexinaV e 5  $\mu$ L de 7-AD as células foram gentilmente vortexadas e a mistura foi incubada por 15 min, em seguida foram adicionados 400  $\mu$ L do tampão de ligação e procedeu-se a leitura no aparelho de citometria de fluxo BD FACSCanto® II. A análise estatística foi realizada utilizando o teste *One-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet comparando-se os tratamentos com controle de veículo utilizando o software GraphPad Prisma 5.0, com significância mínima de  $p < 0,05$ .

### **3.3. Regulação da expressão do gene de DICER por CS em células H727**

#### **3.3.1. Silenciamento de DICER**

Para esse experimento foi utilizado o kit Trilancer-27 siRNA (Origene®). O silenciamento do gene DICER foi realizado utilizando-se um siRNA produto natural por 27 oligonucleotídeos específico para esse gene. Foram plaqueadas  $10^5$  cél/mL em placas de 24 poços. Para o silenciamento utilizou-se o reagente SiTran (Origene®) como veiculador do oligo, mistura reacional foi preparada adicionando-se para cada poço 6  $\mu$ L de SiTran, 10 nM de oligo em um volume final de 680  $\mu$ L de OptiMEM. Essa mistura foi deixada em contato com as células por 4h, em seguida, o meio foi removido, e o CS (100  $\mu$ g/mL) foi

adicionado às células por 48h. Em seguida, foi realizado o ensaio de qPCR para verificação da expressão de DICER frente ao CS.

### 3.3.2. PCR em tempo real (qPCR)

Os primers para detecção de DICER foram obtidos da empresa TIB-MOLBIOL<sup>®</sup>, DICER (5'CAA TGC CAT GTC CAG TTA), e como gene *house keeping*, um gene expresso corriqueiramente nas células, foi utilizado o gene de GAPDH (5' CAA GGC TGA GAA CGG GAA G). Para tal experimento foi extraído o RNA total utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen – 74104). Posteriormente foi obtido o cDNA através da reação: 10µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems), 1 µL de TaqMan Gene Expression Assay Mix (20X) associado à sonda específica para DICER (Applied Biosystems), e 9 µL do cDNA (diluído 1:50) em volume final de 20 µL. As condições de ciclagem foram as seguintes: 50°C por 2 minutos, depois 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (Rotor Gene 3000 – Corbett-Research). O nível de expressão do gene DICER foi calculado baseado na expressão de GAPDH de acordo com o método de  $2^{\Delta CT}$  (2-CT).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação de biomarcadores intermediários em tecidos de pulmão de camundongos

#### Swiss ICR (CD-1<sup>®</sup>) expostos à fumaça de cigarro.

##### 4.1.1. Quantificação de particulado total (PT) nos diferentes grupos de camundongos

Primeiramente, foi mensurada a quantidade total de particulado (PT) administrada a cada grupo (Tabela 1), essa medida foi feita semanalmente durante os intervalos de exposição, os resultados demonstrados representam a média das semanas de exposição.

Tabela 1: Concentração de particulado total administrado aos diferentes grupos de camundongos.

Grupo	Particulado total (mg/m <sup>3</sup> )
A	0
B	119
C	292
D	438

##### 4.1.2. Detecção de adutos de DNA em pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro.

Pode-se observar que houve um aumento dose-dependente nos níveis de adutos de DNA nos pulmões de camundongos expostos à fumaça de cigarro. (Figura 4). Em particular, os níveis de adutos de DNA expressos média  $\pm$  erro padrão foram:  $2,01 \pm 0,9$  adutos/ $10^8$  nucleotídeos no grupo controle negativo (CN),  $3,12 \pm 0,27$  nos camundongos expostos a  $119 \text{ mg/m}^3$  PT ( $P < 0.001$  vs. CN),  $4,52 \pm 0,36$  nos camundongos expostos a  $292 \text{ mg/m}^3$  PT ( $P < 0.001$  vs. CN, e  $P < 0.05$  vs.  $119 \text{ mg/m}^3$  PT), e  $8,02 \pm 1,11$  nos camundongos expostos a  $438 \text{ mg/m}^3$  PT ( $P < 0.001$  vs. CN ou  $119$  ou  $292 \text{ mg/m}^3$  PT).

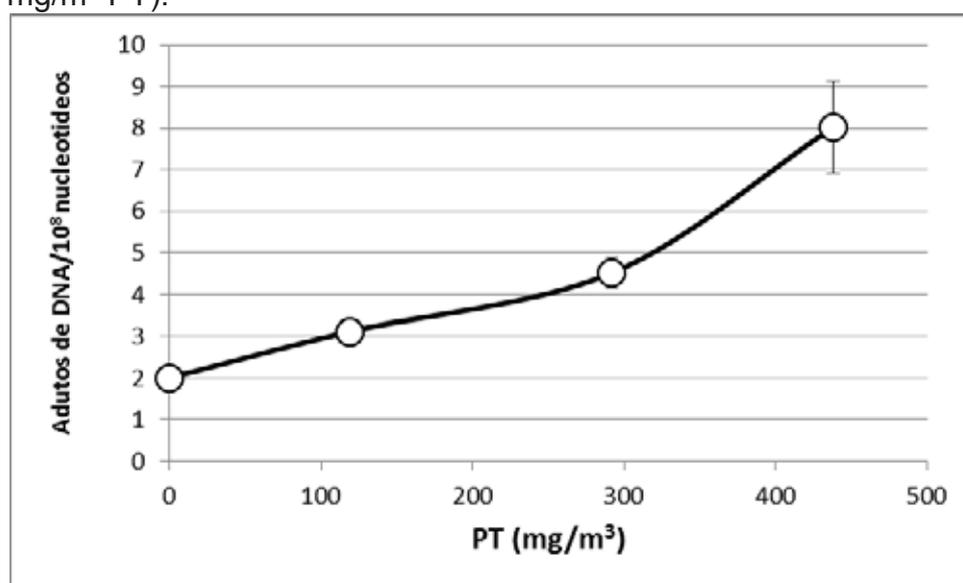


Figura 4: Níveis de adutos de DNA no pulmão de camundongos adultos Swiss ICR(CD-1<sup>®</sup>) expostos desde o nascimento à fumaça de cigarro em variáveis concentrações de PT por 28 dias. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EP Grupo A (controle negativo), Grupo B ( $119 \text{ mg/m}^3$  PT), Grupo C ( $292 \text{ mg/m}^3$  PT), e Grupo D ( $438 \text{ mg/m}^3$  PT). *One-way* Anova pós- teste Dunnet.

#### 4.1.3. Análise da 8-Hidroxi-2'-Deoxiguanosina em células de pulmão de camundongos.

Pode-se observar que houve um aumento dose-resposta nos níveis de 8-oxo-dGuo no pulmão dos camundongos expostos às diversas concentrações de PT (Figura 5). Especificamente, os níveis de 8-oxo-dGuo (média  $\pm$  EP) foram  $1.82 \pm 0.16$  8-oxo-dGuo/ $10^5$  nucleotídeos no controle negativo,  $3.72 \pm 0.42$  nos camundongos expostos a  $119 \text{ mg/m}^3$  PT ( $P < 0.001$  vs. CN),  $4.31 \pm 0.27$  nos camundongos expostos a  $292 \text{ mg/m}^3$  PT ( $P < 0.001$  vs. CN ou  $119 \text{ mg/m}^3$  PT), e  $5.74 \pm 0.35$  nos camundongos expostos a  $438 \text{ mg/m}^3$  TPM ( $P < 0.001$  vs. CN,  $P < 0.01$  vs.  $119 \text{ mg/m}^3$  PT, e  $P < 0.05$  vs.  $292 \text{ mg/m}^3$  PT).

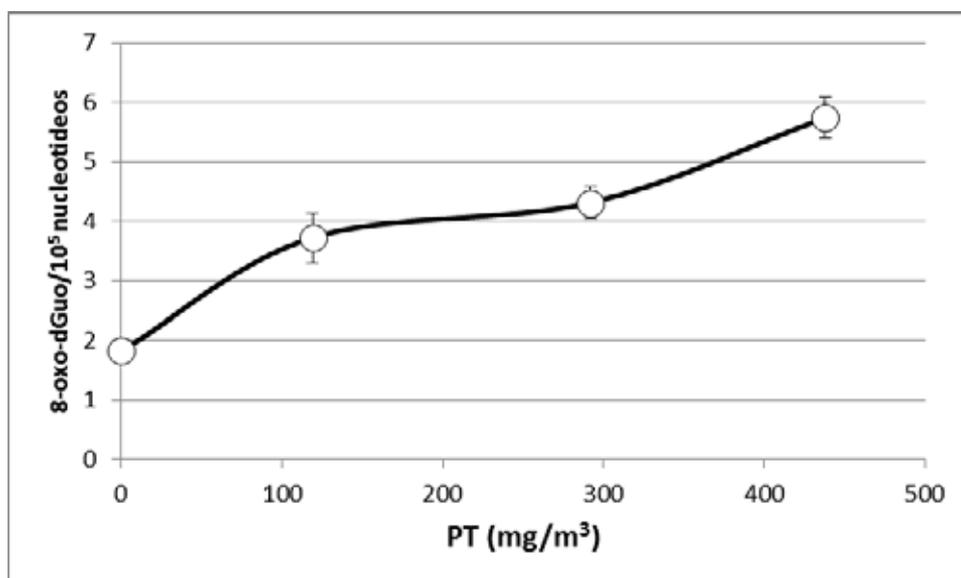


Figura 5: Dano oxidativo avaliado em termos de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo), no pulmão de camundongos Swiss ICR(CD-1<sup>®</sup>) expostos desde o nascimento a diferentes concentrações de PT por 28 dias. Os resultados estão demonstrados em média  $\pm$  EP, Grupo A (controle negativo), Grupo B ( $119 \text{ mg/m}^3$  PT), Grupo C ( $292 \text{ mg/m}^3$  PT) e Grupo D ( $438 \text{ mg/m}^3$  PT). *One-way* Anova pós- teste Dunnet.

## 4.2. Quimioprevenção dos danos causados pelo condensado da fumaça de cigarro em células H727 utilizando nanopartículas

### 4.2.1. Ensaio de MTT para determinação do IC<sub>20</sub> dos quimiopreventivos usados no teste de quimioprevenção em células H727.

Na Figura 6 estão demonstrados os resultados de viabilidade avaliados pelo ensaio de MTT (media  $\pm$  EP) nas células H727 para todos os quimiopreventivos testados neste estudo. A partir desses resultados foi possível determinar o IC<sub>20</sub> dos quimiopreventivos para que fossem realizados os ensaios de quimioprevenção. Para as nanopartículas o IC<sub>20</sub> foi de 8  $\mu$ g/mL; CS = 100 mg/mL; NAC = 3 mM; PEITC = 5  $\mu$ M e RES = 1,25  $\mu$ g/mL. Pode-se observar que não houve um comportamento dose-resposta dos quimiopreventivos.

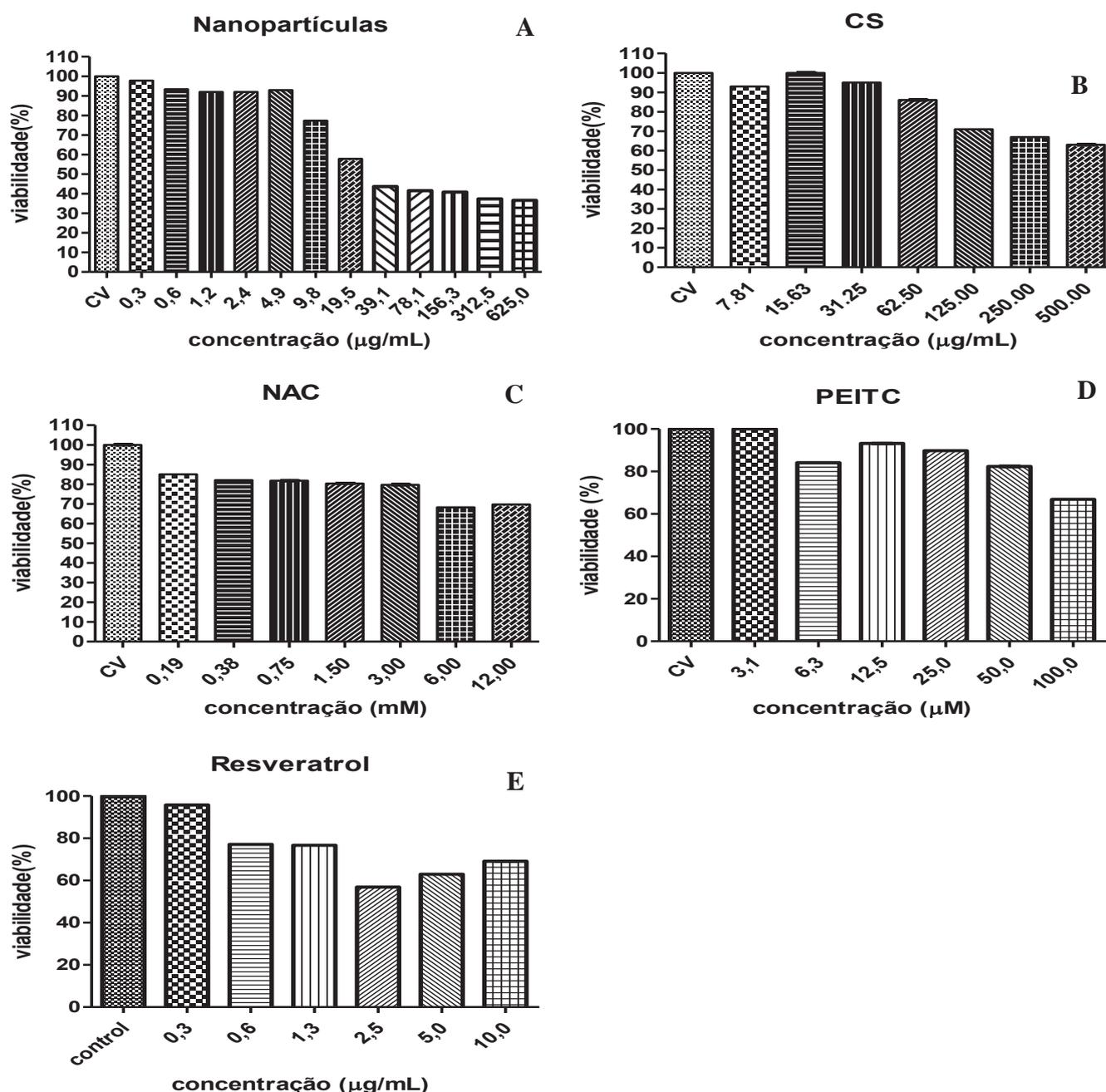


Figura 6: Ensaio de MTT para os quimiopreventivos testados nos ensaios de quimioprevenção frente ao CS em células H727. A) nanopartículas; B) CS; C) NAC; D) PEITC ; E) Resveratrol.

#### 4.2.2. Ensaio de MTT para comparação da resposta de viabilidade dos quimiopreventivos não associados e associados às nanopartículas.

Na figura 7 pode-se observar os resultados do ensaio de MTT para os quimiopreventivos quimiopreventivos utilizados nesse trabalho com e sem associação às nanopartículas. Para o NAC, não houve diferença significativa na resposta citotóxica do produto natural sozinho e associado às nanopartículas (Figura 7A). Já no PEITC (Figura 7B) houve uma redução significativa no números de células viáveis em todos os tratamentos comparando o quimiopreventivo sozinho e associado às nanopartículas ( 6,5 e 25  $\mu\text{M}$   $p < 0,0$ ; 12,5  $\mu\text{M}$   $p < 0,001$ ). Enquanto que para o resveratrol (Figura 7C) pode-se observar um aumento significativo das células viáveis quando o quimiopreventivo foi associado às nanopartículas ( $p < 0,001$ ) em todas as concentrações testadas.

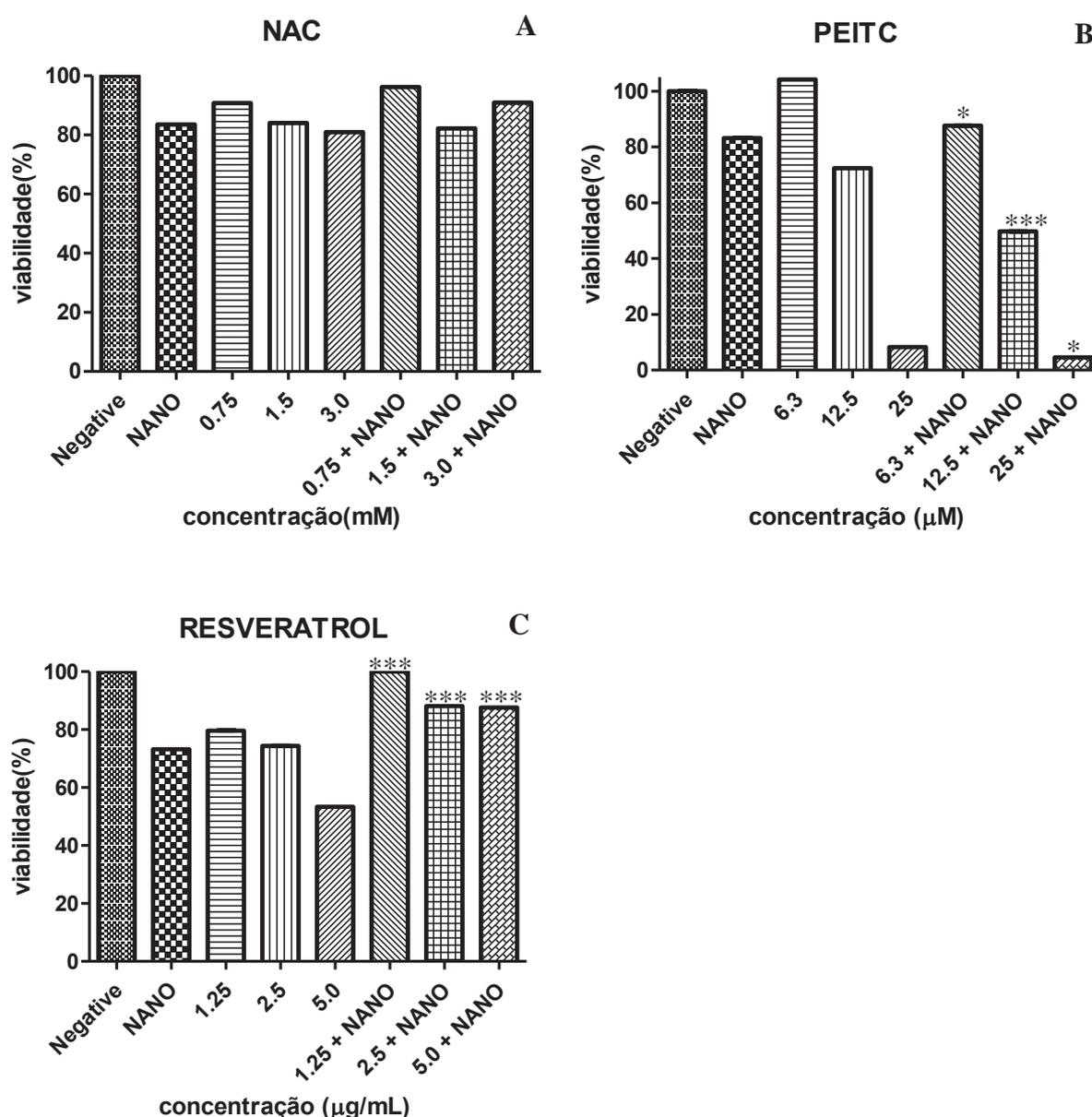


Figura 7: Resposta de viabilidade dos quimiopreventivos sem e com associação às nanopartículas em células H727 através do ensaio de MTT. A) NAC. B) PEITC. C) Resveratrol.\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (quimiopreventivos *versus* quimiopreventivos + nanopartículas). One-way Anova pós- teste Dunnet.

#### 4.2.3. Ensaio do cometa de genotoxicidade e antigenotoxicidade frente ao CS com os quimiopreventivos NAC, PEITC e Resveratrol em células H727.

##### 4.2.3.1. Ensaio de genotoxicidade e antigenotoxicidade com o quimiopreventivo NAC

Na figura 8 estão demonstrados os resultados de genotoxicidade e antigenotoxicidade do produto natural NAC sozinho e associado às nanopartículas. Pode-se observar que o NAC foi genotóxico (Figura 8 A) na maior concentração (3 mM  $p < 0,01$ ) tanto sozinho como associado às nanopartículas, ainda, houve diferença estatística diminuindo a resposta genotóxica quando associado às nanopartículas também na concentração de 3 mM ( $p < 0,001$ ). Já para a antigenotoxicidade (Figura 8 B) observa-se uma redução significativa frente aos danos no DNA ocasionados pelo CS (barras) em todas as concentrações em ambas situações (sem e com nanopartículas) quando comparado com o controle de veículo ( $p < 0,001$ ), já o produto natural associado às nanopartículas reduziu significativamente os danos quando comparado com o produto natural sozinho ( $p < 0,05$ ). Ainda a porcentagem de inibição dos danos (linhas) variou de 90 a cerca de 60% e foi inversamente proporcional às concentrações testadas.

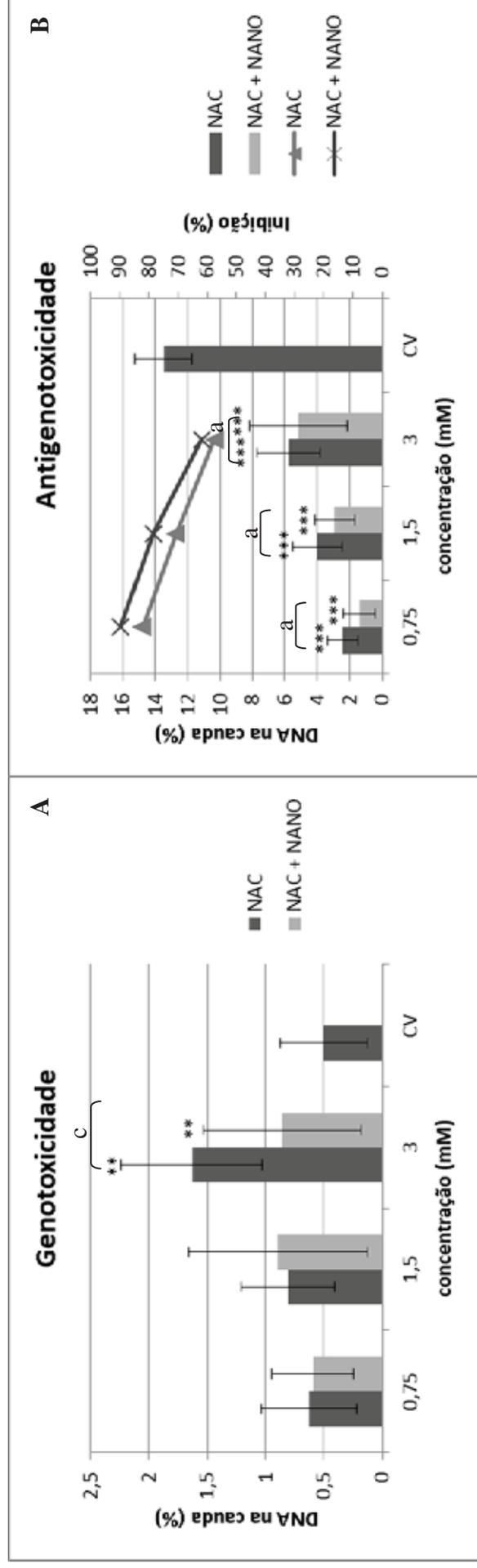


Figura 8: Ensaio do cometa para avaliação da resposta ao dano de DNA de NAC sozinho e associado às nanopartículas em células H727 (média  $\pm$  EP). A) Genotoxicidade, CV = controle de veículo (PBS 0,5% em OptiMEM) \*\* $p < 0,01$  (produto natural versus CV);  $\hat{p} < 0,001$  (produto natural sozinho versus associação com nanopartículas). B) Antigenotoxicidade pré-tratamento com os quimiopreventivos por 24h seguidos de exposição ao CS (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 48h. CV = controle de veículo (PBS 0,5% em OptiMEM + CS a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) \*\*\* $p < 0,001$  (quimiopreventivos versus CV);  $\hat{p} < 0,05$  (produto natural sozinho versus associação com nanopartículas). Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

#### 4.2.3.2. Ensaio de genotoxicidade e antigenotoxicidade com o quimiopreventivo PEITC

Os resultados de genotoxicidade e antigenotoxicidade do produto natural PEITC sozinho e associado às nanopartículas estão demonstrados na figura 9. Pode-se observar que o PEITC foi genotóxico (Figura 9 A) em todas as concentrações quando comparado ao controle de veículo (CV) tanto sozinho como associado às nanopartículas ( $p < 0,001$ ), ainda, houve diferença estatística aumentando a resposta genotóxica quando associado às nanopartículas ( $1,25 \mu\text{M } p < 0,001$ ), e diminuindo a genotoxicidade na concentração de  $2,5 \mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ). Para antigenotoxicidade (Figura 9 B) observa-se uma redução significativa frente aos danos no DNA ocasionados pelo CS (barras) em todas as concentrações em ambas situações (sem e com nanopartículas) quando comparado com o controle de veículo ( $p < 0,001$ ), já o produto natural sozinho reduziu significativamente os danos quando comparado com o produto natural associado às nanopartículas ( $1,25$  e  $2,5 \mu\text{M } p < 0,05$ ), e  $5 \mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ). Ainda a porcentagem de inibição dos danos (linhas) variou em cerca de 10 a 95%.

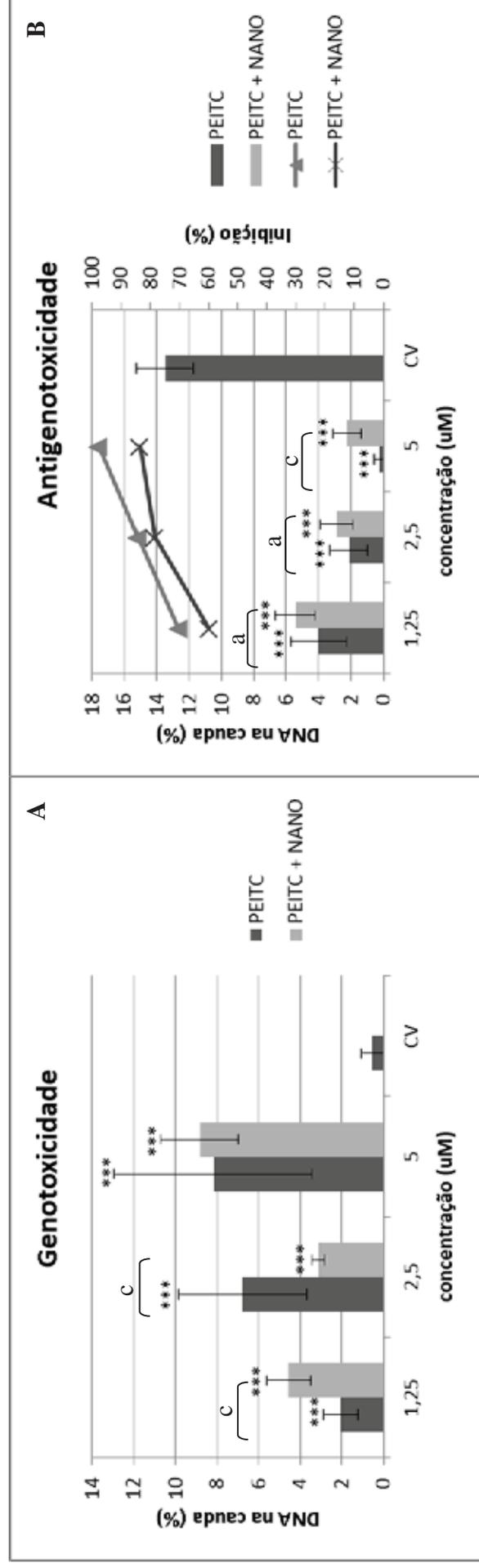


Figura 9: Ensaio do cometa para avaliação da resposta ao dano de DNA de PEITC sozinho e associado às nanopartículas em células H727 (média  $\pm$  EP). A) Genotoxicidade, CV = controle de veículo (PBS 0,5% em OptiMEM) \*\*\* $p < 0,001$  (produto natural *versus* CV);  $^{\circ}p < 0,001$  (produto natural sozinho *versus* associação com nanopartículas). B) Antigenotoxicidade pré-tratamento com os quimiopreventivos por 24h seguidos de exposição ao CS ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) por 48h. CV = controle de veículo (PBS 0,5% em OptiMEM + CS a  $100 \mu\text{g/mL}$ ) \*\*\* $p < 0,001$  (quimiopreventivos *versus* CV);  $^{\circ}p < 0,05$  e  $^{\circ}p < 0,001$  (produto natural sozinho *versus* associação com nanopartículas). Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

#### 4.2.3.3. Ensaios de genotoxicidade e antigenotoxicidade com o quimiopreventivo Resveratrol

Os resultados de genotoxicidade e antigenotoxicidade do produto natural Resveratrol sozinho e associado às nanopartículas estão demonstrados na figura 10. Pode-se observar que o Resveratrol foi genotóxico (Figura 10 A) em todas as concentrações quando comparado ao controle de veículo (CV) somente associado às nanopartículas ( $p < 0,001$ ), portanto, houve diferença estatística quando comparado o produto natural sozinho e associado às nanopartículas ( $p < 0,001$ ). Para antigenotoxicidade (Figura 10 B) observa-se uma redução significativa frente aos danos no DNA ocasionados pelo CS (barras) em todas as concentrações em ambas situações (sem e com nanopartículas) quando comparado com o controle de veículo ( $p < 0,001$ ), já o produto natural sozinho reduziu significativamente os danos quando comparado com o produto natural associado às nanopartículas ( $0,6 \mu\text{g/mL}$   $p < 0,01$ ), e foi observada redução significativa nos danos do produto natural associado às nanopartículas com relação ao produto natural sozinho na concentração de  $1,2 \mu\text{g/mL}$   $p < 0,001$ . Ainda a porcentagem de inibição dos danos (linhas) variou em cerca de 80 a 95%.

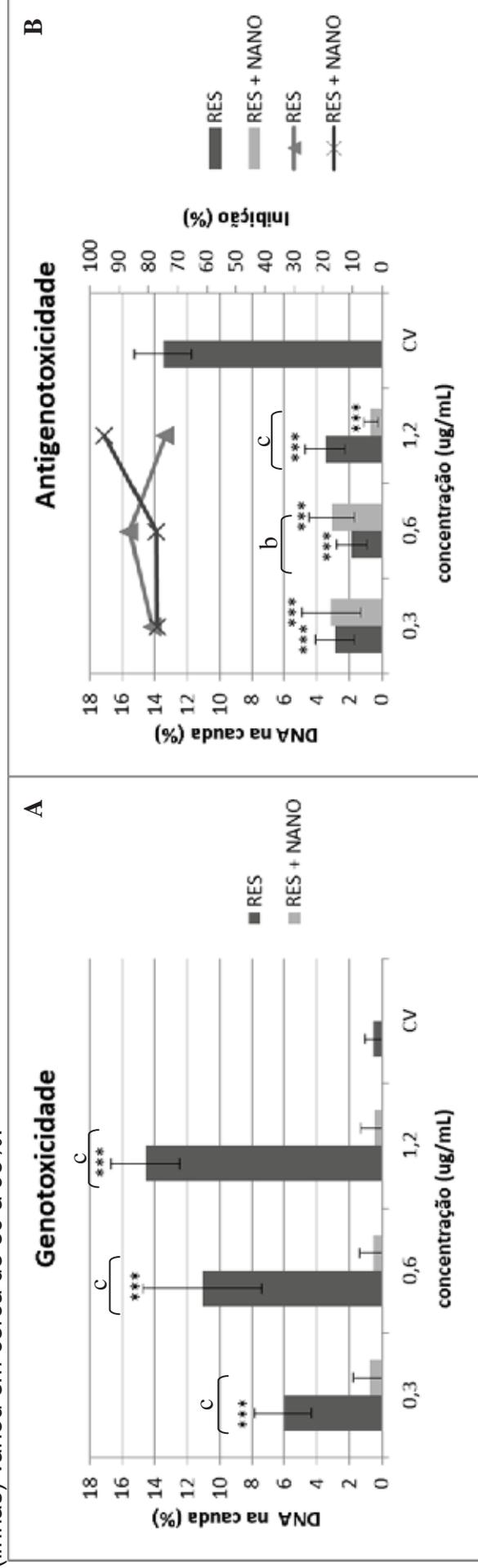


Figura 10: Ensaio do cometa para avaliação da resposta ao dano de DNA de Resveratrol sozinho e associado às nanopartículas em células HT27 (média  $\pm$  EP). A) Genotoxicidade, CV = controle de veículo (PBS 0,5% em OptiMEM)  $^{***}p < 0,001$  (produto natural *versus* CV);  $^{\circ}p < 0,001$  (produto natural sozinho *versus* associação com nanopartículas). B) Antigenotoxicidade pré-tratamento com os quimiopreventivos por 24h seguidos de exposição ao CS ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) por 48h. CV = controle de veículo (PBS 0,5% em OptiMEM + CS a  $100 \mu\text{g/mL}$ )  $^{***}p < 0,001$  (quimiopreventivos *versus* CV);  $^b p < 0,01$  e  $^{\circ}p < 0,001$  (produto natural sozinho *versus* associação com nanopartículas). Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Na Figura 11 pode-se observar imagens dos cometas obtidos no experimento de genotoxicidade.

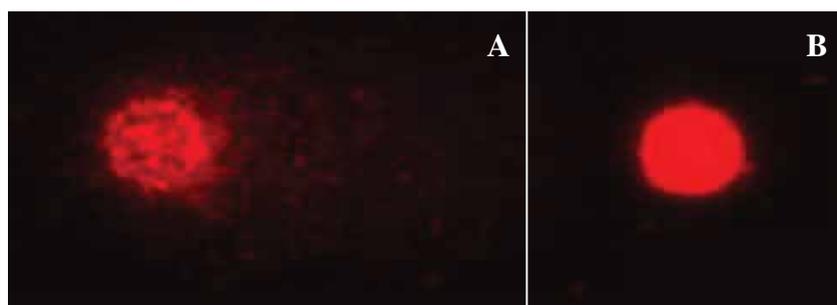


Figura 11: Nucleóides obtidos no ensaio de genotoxicidade. A) Células H727 tratadas com CS (100 µg/mL). B) Controle negativo, células mantidas com meio de cultura.

#### 4.2.4. Ensaio de morte celular – AnexinaV/7-AD para avaliação comparativa dos efeitos dos quimiopreventivos em células H727.

##### 4.2.4.1. Ensaio de morte celular para o quimiopreventivo NAC

Na Figura 12 estão demonstrados os resultados de morte celular para o NAC. Houve aumento significativo no número de células vivas com relação ao controle de veículo (CV) nos tratamentos: 0,75 e 1,5 mM com o produto natural sozinho ( $p < 0,01$ ), quando associado às nanopartículas essa resposta aumentou visivelmente mantendo-se nas concentrações de 0,75 e 1,5 mM ( $p < 0,001$ ). Já no tratamento de 3 mM tanto sozinho como associado às nanopartículas o produto natural reduziu o número de células vivas ( $p < 0,01$ ). Já com relação ao número de células apoptóticas, houve um aumento significativo com relação ao controle de veículo no tratamento do produto natural sozinho a 1,5 e 3,0 mM ( $p < 0,01$ ), e no tratamento combinado com as nanopartículas de 3 mM ( $p < 0,01$ ). Já com relação ao número de células necróticas/apoptose tardia, houve uma diminuição significativa nos tratamentos sozinho e combinado com as nanopartículas para as concentrações de 0,75 e 1,5 mM ( $p < 0,001$ ).

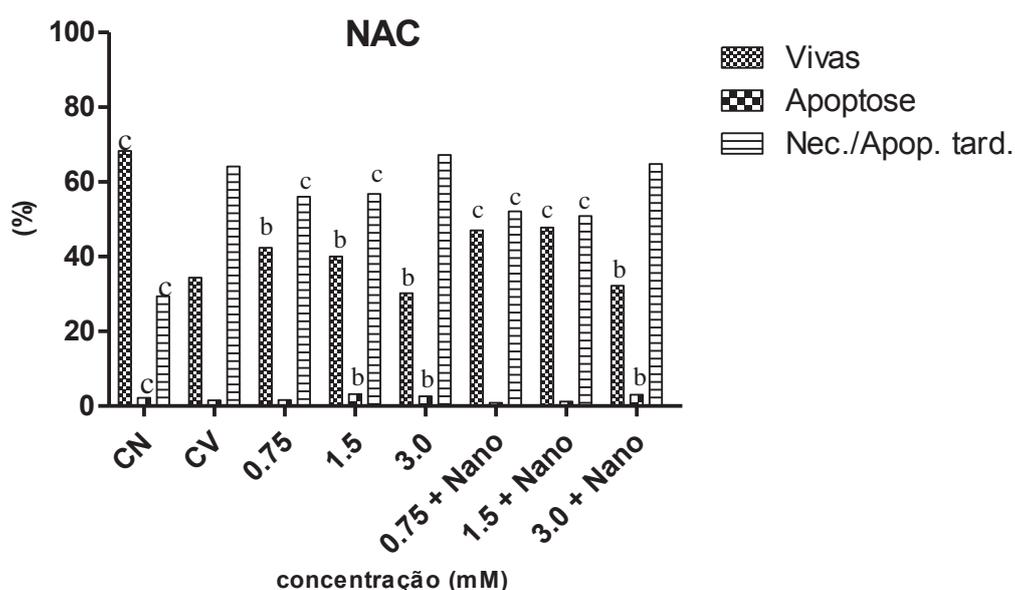


Figura 12: Ensaio de morte celular com NAC em células H727. Pré-tratamento com NAC por 24 h seguido de 48 h de exposição ao CS (100µg/mL). CN = controle negativo (células mantidas somente com meio de cultura) CV versus tratamentos. <sup>b</sup> $p < 0,01$ ; <sup>c</sup> $p < 0,001$ . One-way Anova pós- teste Dunnet.

#### 4.2.4.2. Ensaio de morte celular para o quimiopreventivo PEITC

Pode-se observar na figura 13 o resultado do perfil de morte celular para o produto natural PEITC. O produto natural aumentou significativamente o número de células vivas somente na concentração de 1,25  $\mu\text{M}$  tanto sozinho como em combinação com as nanopartículas ( $p < 0,05$ ). Em contrapartida, houve redução do número de células vivas nos tratamentos do produto natural sozinho nas concentrações de 2,5 ( $p < 0,05$ ) e 5,0  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ), e do produto natural associado às nanopartículas na concentração de e 5,0  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ). Com relação às células apoptóticas houve um aumento com o tratamento de 5,0  $\mu\text{M}$  do produto natural sozinho ( $p < 0,01$ ), e em todas as concentrações associadas às nanopartículas (1,25 e 5,0  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0,01$  e 2,5  $\mu\text{M}$   $p < 0,05$ ). Adicionalmente, houve redução do número de células necróticas/apoptose tardia nos tratamento de 1,25  $\mu\text{M}$  do produto natural sozinho ( $p < 0,05$ ), e 1,25 ( $p < 0,01$ ) e 2,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) do produto natural associado às nanopartículas. Já um aumento no número de células em necrose/apoptose tardia foi observado na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  do produto natural tanto sozinho como em associação com as nanopartículas ( $p < 0,001$ ).

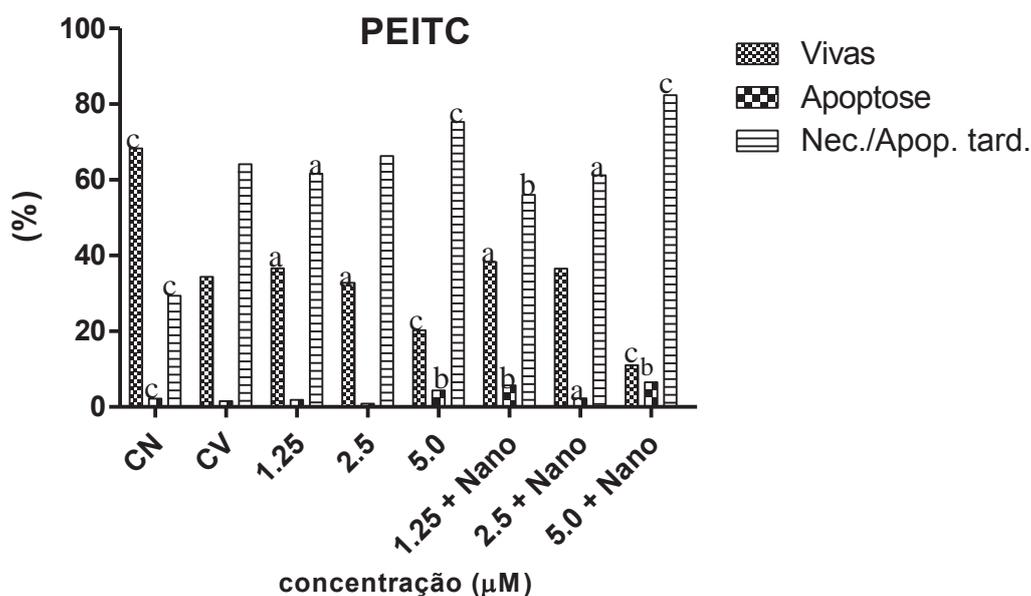


Figura 13: Ensaio de morte celular com PEITC em células H727. Pré-tratamento com PEITC por 24 h seguido de 48 h de exposição ao CS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). CN = controle negativo (células mantidas somente com meio de cultura) CV *versus* tratamentos. <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> $p < 0,01$ ; <sup>c</sup> $p < 0,001$ . *One-way* Anova pós- teste Dunnet.

#### 4.2.4.3. Ensaio de morte celular para o quimiopreventivo Resveratrol

Pode-se observar na figura 14 o resultado do perfil de morte celular para o produto natural Resveratrol. Houve um aumento significativo no número de células vivas somente nas concentrações de 6,3  $\mu\text{g/mL}$  tanto sozinho e 25  $\mu\text{g/mL}$  em combinação com as nanopartículas ( $p < 0,05$ ). Ainda, houve redução do número de células vivas nos tratamentos do produto natural sozinho na concentrações de 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,001$ ), e do produto natural associado às nanopartículas na concentração de e 6,3  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ). Com relação às células apoptóticas houve um aumento com o tratamento 25  $\mu\text{g/mL}$  do produto natural sozinho ( $p < 0,01$ ), nas concentrações de 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  associadas às nanopartículas ( $p < 0,01$ ). Adicionalmente, houve redução do número de células necróticas/apoptose tardia nos tratamento de 6,3  $\mu\text{g/mL}$  do produto natural sozinho ( $p < 0,05$ ), e 12,5 ( $p < 0,05$ ) e 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,01$ ) do produto natural associado às nanopartículas. Adicionalmente, um aumento no número de células em necrose/apoptose tardia foi observado com o tratamento do produto natural tanto na concentração de e 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,001$ ) e do produto natural em associação com as nanopartículas na concentração de 0,05  $\mu\text{g/mL}$ .

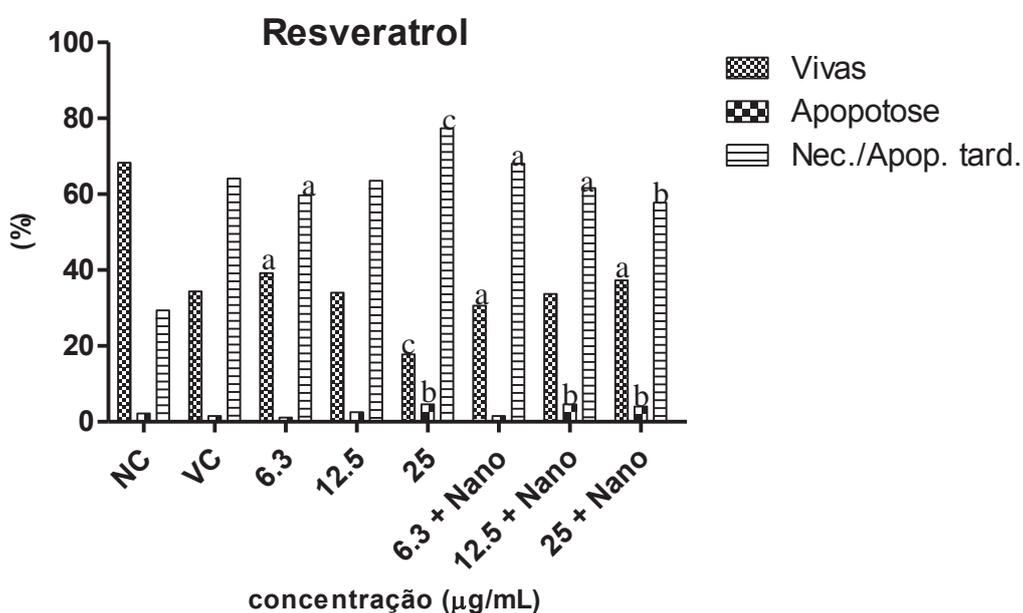


Figura 14: Ensaio de morte celular com Resveratrol em células H727. Pré-tratamento com Resveratrol por 24 h seguido de 48 h de exposição ao CS (100 $\mu\text{g/mL}$ ). CN = controle negativo (células mantidas somente com meio de cultura) CV *versus* tratamentos. <sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> $p < 0,01$ ; <sup>c</sup> $p < 0,001$ . *One-way* Anova pós- teste Dunnet.

#### 4.3. Avaliação do efeito da expressão de DICER frente ao CS em células H727 previamente silenciadas para este gene.

Na tabela 2 estão representados os resultados tanto da concentração total de RNA obtido como da qualidade das amostras.

Tabela 2: Qualidade dos RNAs extraídos para o ensaio de silenciamento de DICER e resposta frente ao CS em células H727.

Amostras	ng/ $\mu$ l	ng total	260/280	260/230
siRNA	41,5	3322,4	1,94	0,82
CV	45,0	3602,4	1,94	1,27
CN--	50,3	4024	1,94	1,66
siRNA + CS	49,3	3947,2	1,92	0,86
CV + CS	50,8	4064	1,97	1,12
CN+ CS	62,7	5012	1,97	0,77

CV = controle de veículo (todos os reagentes, menos o siRNA), CN = células mantidas com meio de cultura, CS = condensado de fumaça de cigarro.

Na figura 15 A é possível observar a expressão diferencial do gene DICER diante dos diversos tratamentos realizados. Pode-se observar que a expressão de DICER foi significativamente reduzida na presença de CS, mesmo sem ser feito o silenciamento como mostram os resultados dos controles de veículo (CV + CS = 0,85) e negativo (CN + CS = 0,71) associados somente ao CS, sendo que quando foi feito o silenciamento associado ao CS (siRNA + CS), o nível de expressão do gene reduziu-se de forma mais significativa (0,65), com relação a apenas ao silenciamento do gene – siRNA (0,85). Ainda, observa-se que os tratamentos não foram citotóxicos como mostrado na figura 15 B.

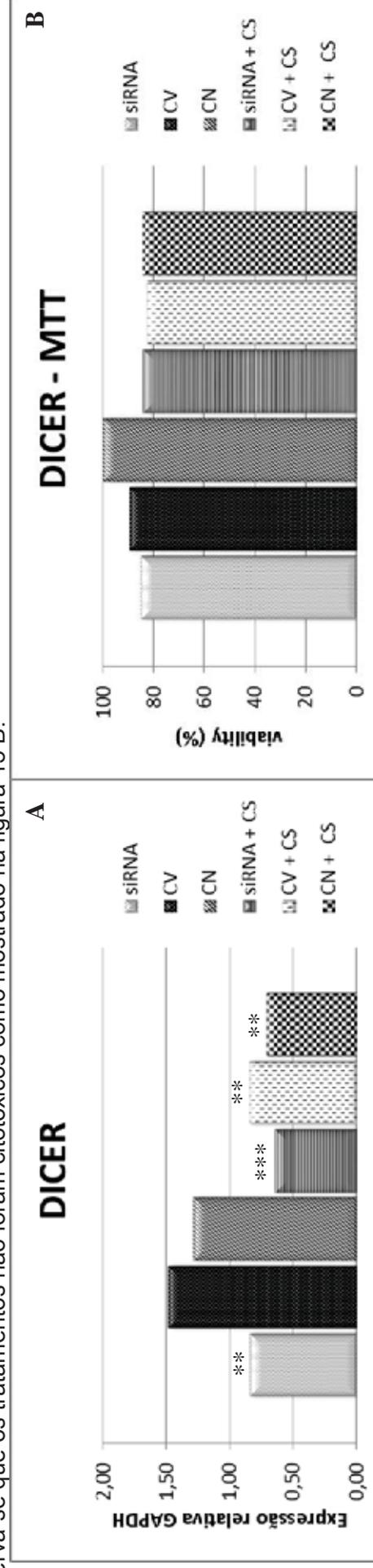


Figura 15: A) análise da expressão relativa de DICER frente ao GAPDH, realizando-se o silenciamento do gene e tratamento com CS. B) Análise da viabilidade das células H727 com os mesmos tratamentos de expressão de DICER. CV = controle de veículo (todos os reagentes, menos o siRNA), CN = células mantidas com meio de cultura, CS = condensado de fumaça de cigarro. \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. One-way Anova pós- teste Dunnet

## 5. DISCUSSÃO

O câncer de pulmão é o tipo de câncer que mais mata em todo o mundo, sendo que o hábito de fumar é a principal causa de desenvolvimento desta doença (NCI, 2005). Desta forma, torna-se importante avaliar métodos de quimioprevenção frente aos efeitos deletérios do fumo de cigarros, e ainda, elucidar os mecanismos moleculares pelos quais os quimiopreventivos derivados da queima do tabaco contribuem para o desenvolvimento do câncer de pulmão.

### 5.1. Avaliação de biomarcadores intermediários em tecidos de pulmão de camundongos Swiss ICR (CD-1<sup>®</sup>) expostos à fumaça de cigarro

Para estudar os efeitos deletérios do fumo de cigarro é necessário estabelecer biomarcadores que se mostrem bons indicadores deste efeito, dessa forma, foi padronizada no laboratório a resposta dos camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro com relação à formação de adutos de DNA e 8-oxo-dGuo.

Os resultados para a formação de adutos de DNA demonstrados na figura 4 demonstram um aumento dose-resposta deste tipo de dano nos camundongos Swiss expostos ao fumo de cigarro, desta forma este biomarcador poderá ser utilizado pelo grupo em trabalhos futuros. A formação de adutos de DNA é um tipo de dano comumente originado por diversos quimiopreventivos, entre eles, podem-se citar substâncias presentes abundantemente na fumaça de cigarro como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e o benzo- $\alpha$ -pireno (GYÖRFFY et al., 2008; DE MARINI, 2004; PFEIFER et al., 2002). Ainda, um estudo recente mostrou que a transversão G $\rightarrow$ T no gene que codifica a proteína p53

torna o indivíduo mais suscetível a formação de adutos de DNA provocados pela fumaça de cigarro (ANNA et al., 2009).

Sabe-se que a fumaça do cigarro possui inúmeras substâncias oxidantes e radicais livres de oxigênio (ROS) responsáveis por iniciar e promover o dano oxidativo ao DNA (THORNE et al., 2009), avaliado neste estudo através da formação de 8-oxo-dGuo. De certo, a dose-resposta positiva para este biomarcador será útil para o delineamento de futuros experimentos, relativos à quimioprevenção de fármacos, frente aos danos de DNA, uma vez que ficou comprovado que realmente, a exposição ao fumo de cigarro da espécie de camundongos Swiss gerou resultados positivos.

## **5.2. Quimioprevenção dos danos causados pelo condensado da fumaça de cigarro em células H727 utilizando nanopartículas.**

A estratégia de utilizar a quimioprevenção como ferramenta para o combate dos efeitos nocivos de agentes mutagênicos vem sendo amplamente utilizada, principalmente com a finalidade de interferir no processo de desenvolvimento ou progressão do câncer. O consumo desses fatores protetores pode ser feito através da ingestão de alimentos ou medicamentos (DE FLORA et al., 2001). Ainda, o uso de nanopartículas vem se mostrando uma ferramenta atual de *liberação de fármacos* para substâncias tradicionais. Entretanto, ainda não existem estudos que demonstrem os efeitos desse tipo em associação com quimiopreventivos nas células de pulmão expostas ao CS. Dessa forma, este estudo verificou o efeito de três quimiopreventivos diferentes: NAC, PEITC e resveratrol associados à nanopartículas lipídicas catiônicas. Adicionalmente, utilizou-se a linhagem celular H727 por ser derivada de um tumor pouco agressivo, e portanto, ser uma linhagem

tumoral que mantém algumas características do tecido de origem (brônquios), ou seja, bem diferenciada.

Primeiramente realizou-se um ensaio de citotoxicidade para determinar quais concentrações dos quimiopreventivos e das nanopartículas seriam utilizados. Dentre os quimiopreventivos testados, o produto natural mais citotóxico foi o PEITC (Figura 7B), sendo que sua citotoxicidade aumentou quando associado às nanopartículas, já o NAC não mostrou alteração significativa entre sua resposta citotóxica quando associado às nanopartículas (7A) enquanto que o resveratrol apresentou citotoxicidade diminuída quando associado às nanopartículas (7C). Esta resposta pode ser justificada pela solubilidade dos quimiopreventivos, ao observar a figura 2 nota-se que o NAC é um produto natural hidrossolúvel, enquanto que o PEITC e o resveratrol possuem baixa hidrossolubilidade. Dessa forma, as nanopartículas lipídicas influenciaram notoriamente o *liberação de fármacos* dos dois quimiopreventivos mais lipossolúveis (PEITC e resveratrol), facilitando o acesso dessas substâncias à célula em meio de cultura aquoso, demonstrando que a associação desses fármacos à nanopartículas pode influenciar na biodisponibilidade desses quimiopreventivos. Tanto o NAC como o resveratrol são citados como agentes que protegem o DNA de danos oxidativos, além de em altas concentrações serem citotóxicos para células tumorais (DE FLORA et al., 2001; ABRAHAM et al., 2012). Já o PEITC, é descrito como um potente agente citotóxico (WU et al., 2011), o que se pode observar nos resultados obtidos neste trabalho. Ainda, um estudo atual mostrou que o resveratrol foi capaz de aumentar a viabilidade de células HBE (bronquiais humanas) (ZHANG et al., 2011), o que possivelmente ocorreu em nosso estudo e foi evidenciado com uma melhora do *liberação de fármacos* pelas nanopartículas.

Em termos de efeito no DNA foram avaliadas a geno e antigenotoxicidade dos quimiopreventivos sozinhos e em associação com as nanopartículas. Para o NAC foi

possível observar que houve efeito genotóxico (Figura 8A) apenas na concentração de 3 mM e que o produto natural foi antígenotóxico em todas as concentrações testadas (Figura 8B). Adicionalmente, houve um pequeno aumento da resposta antígenotóxica quando o produto natural foi associado às nanopartículas, o que indica uma melhora na *liberação de fármacos* do produto natural que não influenciou a viabilidade, mas ficou evidenciado quando observada a interação com o DNA. De fato, o NAC na faixa de concentração testada foi descrito por apresentar atividade antioxidante (NAPIERSKA et al., 2011) o que pode ter sido responsável pela atividade antígenotóxica observada. Já o PEITC nas concentrações usadas foi claramente genotóxico (Figura 9A), e a resposta com e sem o uso de nanopartículas não foi concentração-resposta. Portanto, o efeito do *liberação de fármacos* pelas nanopartículas não foi homogêneo para esta resposta biológica e deve ser melhor avaliado em termos de liberação da substância. O mesmo produto natural protegeu o DNA dos danos causados pela fumaça de cigarro nas mesmas concentrações em que foi genotóxico (Figura 9B), esse tipo de comportamento já foi observado em outros trabalhos (OLIVEIRA et al., 2009). Possivelmente pode estar ocorrendo uma interação do produto natural com as proteínas histonas o que influencia no relaxamento da cromatina facilitando a resposta da célula aos danos no DNA, seja pela ativação de reparo ou transcrição de enzimas detoxificadoras (STERNER e BERGER, 2000), o mesmo perfil foi observado para o resveratrol sem associação com as nanopartículas (Figura 10). De forma interessante, o efeito genotóxico do resveratrol foi significativamente reduzido quando o mesmo foi associado às nanopartículas, eliminando a toxicidade do produto natural (Figura 10A), neste caso o *liberação de fármacos* causou um efeito de detoxificação, o que também foi observado no ensaio de MTT (Figura 7C). Já para a atividade antígenotóxica do resveratrol (Figura 10B) foi observado efeito protetor, que pode estar associado à sua atividade

antioxidante (ABRAHAM et al., 2012), entretanto, não houve correlação dose-resposta quando observado o efeito da substância sozinha e combinada com as nanopartículas.

Para os ensaios de apoptose, foi aplicado o protocolo de quimioprevenção a fim de verificar se havia alteração no perfil de morte celular induzido pelos quimiopreventivos. O NAC (Figura 12) em termos gerais foi capaz de reduzir o número de células mortas, principalmente por necrose e aumentar significativamente o número de células mortas por apoptose, ainda, pode-se observar que as nanopartículas foram capazes de melhorar essa resposta quando associada às menores concentrações do produto natural. Com relação ao NAC, De Flora et al (2001) citam que até o ano 2000 105 estudos foram publicados na base de dados MEDLINE com relação ao perfil de morte celular induzido pelo NAC, sendo que 86,7 % desses estudos demonstravam que o NAC possui a capacidade de inibir a apoptose, 9,5% dizem que o produto natural não alterou o perfil de morte celular por apoptose e, 3,8% dos estudos mostram a capacidade do produto natural em aumentar o número de células mortas por apoptose, de forma interessante os autores ressaltam que a indução de morte por apoptose foi descrita em sua maioria por estudos que utilizaram células tumorais ou transformadas, corroborando com os dados apresentados nesse trabalho. Já o PEITC provocou um aumento no número de células mortas, principalmente por necrose mas também por apoptose (Figura 13), de forma análoga ao NAC, a associação com as nanopartículas potencializou este efeito. O resultado que mais se destaca para o resveratrol foi o aumento no número de células mortas por apoptose (Figura 14). De fato, existem trabalhos atuais que mostram que tanto o PEITC (NAPIERSKA et al., 2012) como o resveratrol (ZHANG et al., 2011) possuem a capacidade de induzir a morte celular por apoptose. Ainda, pode-se notar que no controle de veículo utilizado para esse experimento, o CS provocou claramente na grande maioria (cerca de 30%) morte por necrose, o que indica que esse tratamento com o agente indutor de danos

foi agressivo para as células. Na realidade, seria interessante que o trabalho tivesse sido executado com uma concentração menor de CS que promovesse a morte majoritariamente por apoptose. Essa adequação já está sendo feita e será dada continuidade no estudo depois que estabelecida esta dose. No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho mostram-se promissores com relação ao uso das nanopartículas associadas aos quimiopreventivos no sentido de modular a resposta de morte celular em concentrações menores do que as utilizadas com os quimiopreventivos sozinhos.

Os estudos com quimiopreventivos associados à nanopartículas são escassos na literatura, sendo este um campo que deve ser mais explorado a fim de detectar os mecanismos desta associação. No caso deste estudo, o uso de quimiopreventivos tradicionais associados às nanopartículas mostraram que o *liberação de fármacos* pode potencializar o efeito dessas substâncias e até aumentar sua biodisponibilidade.

### **5.3. Avaliação do efeito da expressão de DICER frente ao CS em células H727 previamente silenciadas para este gene.**

Sabe-se que a enzima DICER é responsável pelo processamento de miRNAs que, por sua vez, foram descritos recentemente por desempenhar papel importante na regulação pós-transcricional (BERNSTEIN et al., 2003). Neste estudo, avaliou-se a possível regulação do CS na expressão de DICER. De fato, com os resultados mostrados na figura 15A pode-se notar que o CS por si só foi capaz de reduzir a expressão desta enzima, e, ainda o tratamento aplicado e o silenciamento do gene não foram tóxicos para a linhagem H727, este é um resultado inédito na literatura. De forma interessante, atualmente, existem estudos focados na caracterização de miRNAs que apresentam correlação com o câncer de pulmão (SHAHNAZ, 2012), e aos efeitos deletérios da fumaça

de cigarro (MARCZYLO et al., 2012). Certamente, a influência no processamento desses miRNAs através da regulação da expressão de DICER será melhor avaliada no futuro pelo grupo, através da correlação desse efeito com biomarcadores usuais para os danos provocados pela fumaça de cigarros.

## 6. CONCLUSÕES

- 1) Observou-se um efeito dose-resposta da formação de adutos de DNA nos camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro;
- 2) Observou-se um efeito dose-resposta da formação de 8-oxo-dGuo de DNA nos camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro;
- 3) Houve uma influência positiva na resposta dos quimiopreventivos NAC, PEITC e resveratrol frente aos danos causados pelo CS na linhagem H727 quando associados com as nanopartículas lipossomais catiônicas, demonstrando que foi possível realizar o *liberação de fármacos* dos mesmos de forma eficaz;
- 4) A expressão do gene DICER foi diretamente diminuída pelo CS em células H727, resultados estes demonstrados por qPCR.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio de doutorado no exterior realizado durante 5 meses na Universidade de Estudos de Genova, Itália, possibilitou um contato enriquecedor com pesquisadores renomados na área de quimioprevenção do câncer como é o caso do Prof. Dr. Silvio De Flora e do Prof. Dr. Alberto Izzotti. Dessa forma, foi possível entrar em contato com novas técnicas de avaliação da quimioprevenção, e o mais importante, participar do delineamento

de estudos relativos ao tema, principalmente com a abordagem de biologia molecular. Ainda, foi desenvolvido um projeto aplicando nanopartículas juntamente com quimiopreventivos utilizando-se de técnicas que já eram conhecidas, entretanto com uma nova abordagem, estabelecendo-se assim uma troca de conhecimentos.

Ainda, a convite do Prof. Dr. Alberto Izzotti foi ministrada uma aula em inglês com o tema de *Cell culture for developing cancer chemopreventive agents*, para os alunos do curso de medicina da Universidade de Estudos de Genova, uma grande experiência em termos didáticos (comprovante anexo).

Por fim, a experiência no exterior dá uma visão de como é feita pesquisa internacionalmente, faz com que se entre em contato com outras culturas ampliando os horizontes tanto profissionais como pessoais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S.K.; ECKHARDT, A.; OLI, R.G.; STOPPER, H. Analysis of in vitro chemoprevention of genotoxic damage by phytochemicals, as single agents or as combinations . **Mutat. Res.**, v. 744(2), p. 1171-24, 2012.

ALBERG, A.J.; FORD, F.G.; SAMET, J.M.Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2<sup>a</sup> ed.).**Chest** 2007;132(3):29S–55S.

Author(s): Napierska Dorota; Rabolli Virginie; Thomassen Leen C. J.; et al.

BERNSTEIN, E.; KIM, S.Y.; CARMELL, M.A.; MURCHISON, E.P.; ALCORN, H.; LI, M.Z. Dicer is essential for mouse development. **Nat. Genet.**, v. 35 (3), p. 215-217, 2003.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTINI, F.; BALANSKY, R.M. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. **Carcinogenesis**, v. 22 (7), p. 999-1013., 2001.

DE MARINI, D. M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. **Mutat. Res.**, v. 567, p. 447–474, 2004.

GYÖRFFY, E.; ANNA, L.; KOVA, CS; K., RUDNAI, P.; SCHOKET, B. Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts. **Mutagenesis**, v. 23, p. 1–18, 2008.

HE, L.; HANNON, G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat. Reviews**, v. 5(7), p. 522-531, 2004.

HUANG, J.; PLASS, C; GERHAEUSER, C. Cancer Chemoprevention by Targeting the Epigenome. **Current Drug Targets**, v. 12 (13), p. 1925-1956, 2011.

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 83: Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Lyon: International Agency for Research on Cancer (2004).

INCA – Instituto Nacional do Câncer -  
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. (2012)

KARIKAS, G.A. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. **J. Buon**, v. 15 (4), p. 627-638, 2010.

KASSIE, F.; MELKAMU, T.; ENDALEW, A.; UPADHYAYA, P.; LUO, X.; HECHT, S.S. Inhibition of lung carcinogenesis and critical cancer-related signaling pathways by N-acetyl-S-(N-2-phenethylthiocarbamoyl)-l-cysteine, indole-3-carbinol and myo-inositol, alone and in combination. **Carcinogenesis**. v. 31(9), p. 1634-1641, 2010.

LU, X.Y.; HU, S.; JIN, Y.; QIU, L.Y. Application of liposome encapsulation technique to improve anti-carcinoma effect of resveratrol. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 38(3), p. 314-322, 2012.

MARCZYLO, E.L.; AMOAKO, A.A.; KONJE, J.C.; GANT, T.W.; MARCZYLO, T.H. Smoking induces differential miRNA expression in human spermatozoa A potential transgenerational epigenetic concern? **Epigenetics**. v. 7(5), p. 432-439, 2012.

Mirbase: [http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_summary.pl?org%40hsa](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org%40hsa). [May 2011].

Mirecords: <http://mirecords.biolead.org/>. [May 2011].

MOURIA, M. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. **Int. J. Cancer**, v. 98, p. 761–769, 2002.

NAPIERSKA, D.; RABOLLI, V.; THOMASSEN, L.C.; DINSDALE, D.; PRINCEN, C.; GONZALEZ L.; POELS K.L.; KIRSCH-VOLDERS, M.; LISON, D.; MARTENS, J.A.; HOET, P.H. Oxidative Stress Induced by Pure and Iron-Doped Amorphous Silica Nanoparticles in Subtoxic Conditions. **Chem Res Toxicol.**, 25(4), p. 828-837, 2012.

NCI – National Cancer Institute. <http://cancer.org> (2005)

NCI – National Cancer Institute. <http://cancer.org> (2012)

OLIVEIRA, A.M.; SANTOS, R.A.; SANTOS, A.G.; CSIPAK, A.R.; OLIVATO, C.; BASSI, C.L.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; TAKAHASHI, C.S.; SOARES, C.P. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells, **Mutagenesis**, v. 24, p. 501-506, 2009.

OTSUKI, Y. Various methods of apoptosis detection. **Acta Histochem. Cytochem.**, v.33(4), 235-241, 2000.

PAPADOPOULOS, G.L.; RECZKO, M.; SIMOSSIS, V.A.; SETHUPATHY, P.; HATZIGEORGIU, A.G. The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. **Nucleic Acids Res.**, v.37, p. 155-158, 2009.

PFEIFER, G. P.; DENISSENKO, M. F.; OLIVIER, M.; TRETYAKOVA, N.; HECHT, S. S.; HAINAUT, P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. **Oncogene**, v. 21, p. 7435–7451, 2002.

SHAHNAZ, B. Molecular changes in smoking-related lung cancer. **Expert Rev. Mol. Diagn.**; v. 12(1), p. 93-106, 2012.

STERNER, D.E.; BERGER, S.L. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**; v. 64 (2) 435-459, 2000.

SUBBARAMAIAH, K. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 889, p. 214–223, 1999.

TANG, N-Y.; HUANG, Y-T.; YU, C-S. Phenethyl Isothiocyanate (PEITC) Promotes G(2)/M Phase Arrest via p53 Expression and Induces Apoptosis through Caspase- and Mitochondria-dependent Signaling Pathways in Human Prostate Cancer DU 145 Cells. **Antican. Res.**, v. 31 (5), p. 1691-1702 (2011).

THORNE, D.; WILSON, J.; KUMARAVEL, T.S.; MASSEY, E.D; MCEWAN, M. Measurement of oxidative DNA damage induced by mainstream cigarette smoke in cultured NCI-H292 human pulmonary carcinoma cells. **Mutat Res.**, v. 673 (1), p. 3-8, 2009.

U.S. Department of Health and Human Services. How Tobacco Smoke Causes Disease: A Report of the Surgeon General (2010).

U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General (2004).

VANDEN BERGHE, W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. **Pharmacol Res.**, v. 65(6) p. 565-576, 2012.

WU, C.L.; HUANG, A.C.; YANG, J.S.; LIAO, C.L.; LU, H.F.; CHOU, S.T.; MA, C.Y.; HSIA, T.C.; KO, Y.C.; CHUNG, J.G. Benzyl Isothiocyanate (BITC) and Phenethyl Isothiocyanate (PEITC)-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species Causes Cell Cycle Arrest and Induces Apoptosis via Activation of Caspase-3, Mitochondria Dysfunction and Nitric Oxide (NO) in Human Osteogenic Sarcoma U-2 OS Cells. **J. Orthop. Res.**, v. 29(8), p. 1199-1209, 2011.

WU, Y.; CRAWFORD, M.; YU, B.; MAO, Y.; NANA-SINKAM, S.P.; LEE, L.J. MicroRNA delivery by cationic lipoplexes for lung cancer therapy. **Mol Pharm.**, v. 8 (4), p. 1381-1389, 2011.

ZHANG, H.; SHIH, A.; RINNA, A.; FORMAN, H.J. Exacerbation of tobacco smoke mediated apoptosis by resveratrol: An unexpected consequence of its antioxidant action **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 43(7), p. 1059-1064, 2011.

## **Capítulo 3**

## Ethanol extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells

Aline M. de Oliveira, André G. dos Santos<sup>1</sup>, Raquel A. dos Santos<sup>2</sup>, Angélica R. Csipak, Camila Olivato, Isabel C. da Silva, Maura B. de Freitas, Carmen L. Bassi<sup>3</sup>, Alberto J. Cavalheiro<sup>4</sup>, Vanderlan S. Bolzani<sup>4</sup>, Dulce H. S. Silva<sup>4</sup>, Elza T. Sakamoto-Hojo<sup>2</sup>, Catarina S. Takahashi<sup>2</sup> and Christiane P. Soares\*

Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Brazil  
<sup>1</sup>Department of Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, Brazil, <sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Philosophy Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Brazil, <sup>3</sup>Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, Federal University of Mato Grosso, Avenida Fernando Corrêa, s/n°, Brazil and <sup>4</sup>Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Chemistry Institute, São Paulo State University, Araraquara, Rua Professor Francisco Degni s/n, Brazil

*Casearia sylvestris* is used in Brazil as a popular medicine to treat ulcer, inflammation and tumour. Caseargrewiin F is a clerodane diterpene isolated from the ethanolic leaf extract of *C. sylvestris*. The aim of the study was to assess the capacity of the ethanolic extract of *C. sylvestris* leaves and caseargrewiin F to protect DNA and verify if both the compounds cause some DNA damage, using the micronucleus (MN) test and comet assay in mice. Balb-C mice were treated with the extract [3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 and 75 mg/kg body weight (b.w.)] and caseargrewiin F (0.16, 0.32, 0.63, 1.3, 2.5 and 3.8 mg/kg b.w.) for 14 days. On day 15, DNA damage was induced by intra-peritoneal (i.p.) injection of cyclophosphamide (CP) (i.p.) at 50 mg/kg b.w. after the MN test and comet assay were performed. A protective effect of ethanolic extract was observed in MN test (6.25 and 12.5 mg/kg b.w.) and the comet assay (3.13 and 6.25, 12.5 and 25 mg/kg b.w.). Caseargrewiin F showed protective effect at 0.63, 1.3 and 2.5 mg/kg b.w. only in comet assay. We also tested the ability of compounds of *C. sylvestris* to induce MN and to increase the comet assay tail moment. The experimental design was similar to the DNA protection assay except that in test groups we omitted the CP challenge. We observed increased damage at 50 and 75 mg/kg b.w. of ethanolic extract of *C. sylvestris* and caseargrewiin F at 3.18 mg/kg b.w. in both the MN test and comet assay. We conclude that ethanolic extract of *C. sylvestris* and caseargrewiin F can protect cells against DNA damage induced by CP at low concentrations, but at high concentrations these compounds also induce DNA damage.

### Introduction

Medicinal herbs have long been used in medical treatment and are still the sole remedy against several diseases in many parts of the world (1). Also, many natural products present in fruits,

beverages and vegetables may be regarded as protective or even anti-proliferation agents for several types of human cancer (2).

Some Brazilian natural products, including those that are isolated from *Casearia sylvestris*, are used in folk medicine, despite their potential toxicity. *C. sylvestris* Swartz (Salicaceae) (3) is a tree widely distributed in Brazil, from Amapá in the north down to Rio Grande do Sul and it is found in a variety of ecosystems from the savannah-like the Cerrado to the tropical Atlantic Rain forest and the equatorial Amazon forest. Moreover, it has also been found in Mexico and the Antilles (4).

*Casearia sylvestris* is commonly known as 'guaçatonga' and used widely for its anti-inflammatory and anti-ulcerative activities (4–6) as well as its cytotoxic activity against malignant tumour cells (7). In addition, the bark of *C. sylvestris* has been used against fever and for treatment of herpes virus and diarrhoea (8). Phytochemical investigations revealed that the major compounds isolated from *C. sylvestris* exhibited both cytotoxic and anti-fungal activities (7).

Caseargrewiin F is a clerodane diterpene, found in plants of the *Casearia* genus, described as a colourless and amorphous solid (9). While caseargrewiin F was not shown to be cytotoxic to human epidermoid carcinoma in the mouth, it exhibited cytotoxicity against human breast cancer cells and human small cell lung cancer. In the present study, caseargrewiin F was isolated from the leaves of *C. sylvestris*.

In order to complement the studies of biological activity of compounds isolated from *C. sylvestris*, the aim of the present study was to determine whether the ethanolic extract of leaves of *C. sylvestris* and caseargrewiin F protect cells against DNA-induced damage or induce DNA damage by themselves, using the micronucleus (MN) test and comet assay in Balb-C mice.

### Materials and methods

#### Plant material and preparation of extract

Leaves of *C. sylvestris* Swartz (Salicaceae) were collected at the Parque Estadual Carlos Botelho (São Miguel Arcaño, São Paulo, Brazil) in March and July 2004. Voucher specimens are deposited at the Herbarium 'Maria Eneida P. Kaufmann' (Instituto Botânico do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil) with the reference numbers AGS04, AGS05, AGS06, AGS13 and AGS19. The plant material was identified by Dr Ines Cordeiro (Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil). Dried and powdered leaves of *C. sylvestris* (20.5 kg) were extracted with ethanol (ca. 200 litre) in a stainless steel extractor with solvent re-circulation for ca. 24 h at 40°C. The crude extract was concentrated under reduced pressure (rotaevaporator) and dried in a desiccator over silica gel under reduced pressure to yield 1.5 kg of dry residue.

#### Identification of compounds in the extract

The identification of compounds in ethanolic extract of *C. sylvestris* was carried out in Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Chemistry Institute, São Paulo State University, by Andre Gonzaga dos Santos.

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +55 16 33016554; Fax: +55 16 33220073; Email: soarescp@hotmail.com

**High performance liquid chromatography-diode array detector analysis** A 9.90 mg of dried extract was submitted to solid phase extraction (SPE) (C-18 Merck®; 2 × 1 cm × 40–63 µm) and eluted with methanol: water (98:02, v/v, 5.0 ml). The sample was dried in a desiccator over silica gel under reduced pressure, dissolved in 4.0 ml of methanol and filtered through 0.22 µm membrane filter (PVDF Millipore®) into a high performance liquid chromatography (HPLC) vial. The reference standard used in this work—caseargrewiin F and casearin U—was purified and identified in the laboratories of Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Chemistry Institute, São Paulo State University, Araraquara, Brazil; for details see Santos *et al.* (10). The standard solutions were prepared by weighing an appropriate amount of caseargrewiin F into a volumetric flask. After diluting with methanol, the standard solutions (0.0079, 0.0159, 0.0635, 0.2540 e 0.5080 mg/ml) were filtered through 0.22 µm membrane filter (PVDF Millipore®) into a HPLC vial before injections. Analytical reversed-phase HPLC was performed using a Varian® ProStar system (comprising a model 240 pump, a 410 autosampler and a 330 photodiode array detector), with control and data handling managed by Star® Chromatography software. Analysis was conducted using a Phenomenex® Gemini C-18 column (250 × 4.6 mm, 5 µm) eluted with a gradient of acetonitrile: methanol: water (from 44:22:34 to 47:53:00, v/v/v, in 42 min) and acetonitrile: methanol (53:47, v/v, in 5 min); flow rate 0.8 ml/min; detection range 210–400 nm; injection volume 20 µl. Analysis was realized in triplicate.

**Gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry analysis** A 5.0 mg of dried extract was submitted to SPE (2 × 1 cm) from silica gel (60–200 µm; Merck®): activated charcoal (Synth®) (1:1, w/w) eluted with hexane: ethyl acetate (95:05, v/v, 5.0 ml). The sample was dried and diluted in hexane to afford 1.0 mg/ml solution. Gas chromatography (GC) analysis was performed on a Shimadzu QP2010 gas chromatograph with flame ionization detector using a DB-5 column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). The carrier gas was He at a flow rate of 1.33 ml/min, split mode with ratio of 1:20 and injection volume of 1 µl. Injector and detector temperatures were 240 and 250°C, respectively. The oven temperature was programmed from 60°C, with an increase of 3°C/min, to 240°C. Gas chromatography-mass spectrometry analysis was conducted using the same system and conditions interfaced to a mass spectrometer instrument equipped with an ion trap detector operating in electron impact mode at 70 eV. The compounds were identified by their retention indexes, calculated by linear interpolation relative to retention times of a series of n-alkanes (11) and by comparison of their mass spectra with those of Wiley 7.0 library and of the literature (11). Compound concentrations were calculated from the GC peak areas.

**<sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance analysis** Dried extract was diluted in CDCl<sub>3</sub> (50.0 mg/ml) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained using a Varian INOVA® 500 11.4 T instrument with CHCl<sub>3</sub> as internal standard.

#### Ethanol extract emulsions

The ethanolic extract of *C. sylvestris* was dissolved in Tween 20 (20%). Balb-C male mice were treated with 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 and 75 mg/kg. The concentrations of the test were chosen based on the high solubility of the ethanolic extract in the Tween 20 (20%).

#### Purification and structure determination of caseargrewiin F

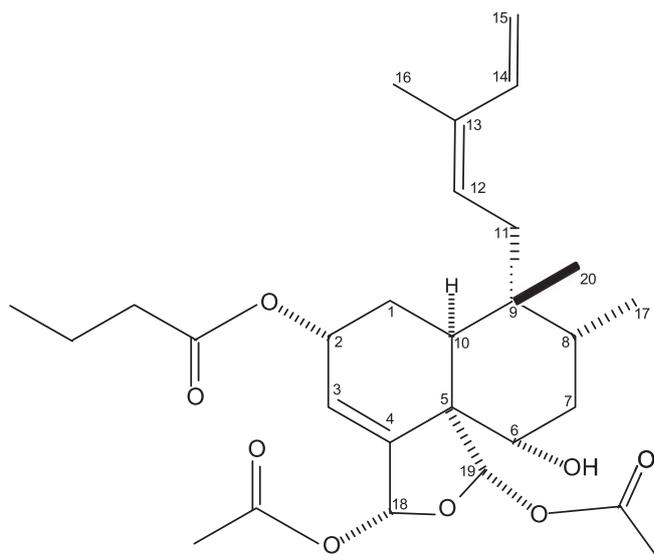
Dried and powdered leaves of *C. sylvestris* were extracted by steeping in ethanol. The dried extract obtained was separated by SPE on silica gel: activated charcoal and fraction SPE2 was separated further by normal-phase low-pressure column chromatography (CC) on silica gel. Fractions CC15–19 were purified by preparative reversed-phase (C<sub>18</sub>) HPLC to yield caseargrewiin F (850.0 mg). The structure of the compound was determined from spectrometric data (nuclear magnetic resonance, ultraviolet, infrared and mass spectrometry) and by comparison with spectral information available in the literature. For details see Santos *et al.* (10). The chromatographic purity of the caseargrewiin F in the assays used was 98.6% (HPLC-UV detected at 235 nm).

#### Caseargrewiin F emulsions

Caseargrewiin F (Figure 1) was emulsified in 6% Tween 80 for both assays in mice. The Balb-C male mice were treated with 0.16, 0.32, 0.63, 1.3, 2.5 and 3.8 mg of caseargrewiin F per kg body weight (b.w.). These concentrations were based on ethanolic extract from *C. sylvestris* in which doses of 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 and 75 mg/kg b.w. were used; since caseargrewiin F represents 4% of the ethanolic extract, we selected doses that are ~4% of the ethanolic extract doses.

#### Animals

Six-week-old Balb-C male mice were maintained under controlled conditions of temperature (22 ± 2°C) and humidity (55 ± 10% room humidity), in a 12-h light/dark cycle. Before the experiments, the animals were acclimatized for 1 week, during which they had free access to a commercial diet (Purina®) and



**Fig. 1.** Chemical structure of caseargrewiin F.

water. The study was conducted with approval of Brazilian Ethics Committee to Experimentation Animals (process CEP/FCF/CAr n° 01/2006).

#### Mutagenic chemical—Positive control

Cyclophosphamide (CP, Sigma–Aldrich Co., St Louis, MO, Lot. No. 036K1225, purity 99%) was used as mutagenic agent in experiments. CP was diluted in 0.9% NaCl just before use and the animals were exposed to the chemical by intra-peritoneal (i.p.) injection of 50 mg/kg b.w. in 0.3 ml.

#### Mutagenicity—MN test

**Experimental design** The assays were performed using eight animals/group. Group 1 (negative control) mice received only drinking water (0.6 ml per day by gavage) for 2 weeks before treatment with 0.9% NaCl by i.p. injection of 0.3 ml. Group 2 (positive control) also received drinking water for 2 weeks and was treated on day 15 with CP (50 mg/kg b.w., i.p.). Group 3 was treated with Tween 20 (20%) or Tween 80 (6%), 0.6 ml by gavage, for 2 weeks and on day 15 the mice were injected i.p. with 0.3 ml 0.9% NaCl. Groups 4–9 were treated for 2 weeks by gavage (0.6 ml per day per animal) with various concentrations of ethanolic extract (3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 and 75 mg/kg b.w.) or caseargrewiin F (0.16, 0.32, 0.63, 1.3, 2.5 and 3.8 mg/kg b.w.). These groups also received treatment with 0.3 ml 0.9% NaCl by i.p. on day 15. Bone marrow from each animal was collected 24 h after the last administration (12).

The bone marrow MN test was carried out as described by Schmid (13). All slides were stained with May-Grunwald Giemsa and coded to avoid observer bias. For each experimental point, 1000 polychromatic erythrocytes (PCEs) were scored to determine the percentages of micronucleated PCE. The ratio of PCEs to normochromatic erythrocytes (NCEs) (PCEs/NCEs) was determined in 200 cells.

**Genotoxicity—comet assay** For the comet assay, the experimental design was the same as for the MN test in mice. Peripheral blood was collected in heparinized capillary vials and kept on ice until use. The alkaline version of the comet assay (single cell gel electrophoresis) was performed as described by Singh (14). Briefly, 20 µl of blood was taken, homogenized with low-melting point agarose, spread on microscope slide pre-coated with normal melting point agarose and covered with a coverslip. After 5 min at 4°C, the coverslip was removed from slides and they were immersed in cold lysing solution (2.4 M NaCl; 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); 10 mM Tris, 10% dimethylsulfoxide and 1% Triton-X, pH 10) for 24 h. After lysis, the slides were placed in an electrophoresis chamber, covered with electrophoresis buffer (300 mM NaOH plus 1 mM EDTA, pH >13) and left for 20 min for the DNA to unwind. The electrophoresis was run for 20 min (25 V and 300 mA), after which the slides were submerged for 15 min in neutralization buffer (0.4 M Tris–HCl, pH 7.5) and fixed in 96% ethanol for 5 min. Slides were prepared in duplicate with ethidium bromide and 50 cells were screened per sample in a fluorescent microscope (ZEISS®, Germany) equipped with an excitation filter of 515–560 nm, a barrier filter of 590 nm and a ×40 objective. The level of

DNA damage was assessed by an image analysis system (TriTek CometScore™ 1.5, 2006) and the percentage of DNA in tail was obtained.

#### Antimutagenicity—MN test

**Experimental design** In Group 1 (negative control), mice received only drinking water (0.6 ml per day by gavage) for 2 weeks before treatment with 0.9% NaCl by i.p. injection. Group 2 (positive control) also received drinking water for 2 weeks and were treated on day 15 with CP (50 mg/kg b.w., i.p.). Group 3 was treated with 0.6 ml Tween 20 (20%) or Tween 80 (6%) by gavage, for 2 weeks, and on day 15 received CP (50 mg/kg b.w., i.p.); the aim of this group is to ensure that Tween has no influence in possible DNA protective effect. Groups 4–9 were treated by gavage (0.6 ml per day per animal) with solutions of ethanolic extract of *C.sylvestris* (3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 and 75 mg/kg b.w.) and caseargrewiin F (0.16, 0.32, 0.63, 1.3, 2.5 and 3.8 mg/kg b.w.) for 2 weeks and, on day 15, CP (50 mg/kg b.w., i.p) was administered. Bone marrow was taken 24 h of CP after the injection (12). The MN test was performed as described previously for the mutagenicity assays.

#### Antigenotoxicity—comet assay

The experimental design for the Comet assay was the same as for antimutagenicity MN test and the comet assay for antigenotoxicity was carried out as described for the genotoxicity assay. Recently, Collins *et al.* (15) described that when comet assay is performed in *in vivo* experiments low concentrations of genotoxic agents are unlikely to induce significant cytotoxicity, they also affirm that a low comet assay DNA damage would be a better indicator that cells are alive than common cytotoxicity tests. In this context, to the comet assay we did not performed cytotoxicity test once at low concentrations, the compounds were not genotoxic and consequently did not present cytotoxicity that could influence in antigenotoxicity assay.

#### Statistical analysis

For a statistical interpretation, results were analyzed with Sigma Stat 3.5, Systat, CA. The Shapiro–Wilk test was used to test data for normal distribution, in all assays performed in the study. Since the results did not show normal distribution, non-parametric tests were applied. In mutagenicity/genotoxicity assays, the Mann–Whitney *U* test was used to compare DNA damage with the negative control. In the MN tests, the PCE/NCE ratio was evaluated with the Kruskal–Wallis test. In antimutagenicity/antigenotoxicity assays, Mann–Whitney *U* test was used to compare all groups tested with the Tween 20 (20%) plus CP group, to assess the decrease in DNA damage. To test whether any groups demonstrated significant reduction in DNA damage to basal levels, those groups were also compared with negative control by the Mann–Whitney *U* test.

## Results

#### Identification of compounds in the extract

The <sup>1</sup>H NMR spectrum from extract showed signals with absorptions in  $\delta$  1.98–2.09, 2.20–2.40, 3.43, 5.07–5.45, 6.25–6.75, similar to those described for casearins and other clerodane diterpenes isolated from *C.sylvestris* (10,16–18). Both casearin U and caseargrewiin F were identified in the

extract. However, casearin U was not assayed in the present study. Quantitative High performance liquid chromatography–diode array detector analysis demonstrated that the content of caseargrewiin F in the extract was 40.0 mg/g. Additionally, the chromatogram (Figure 2) presented 29 peaks with UV spectrum similar to observed for casearins and caseargrewiin F ( $\lambda_{\max} = 231$ – $236$  nm). The results of chemical analysis suggest the presence of these clerodane diterpenes in the extract.

#### Mutagenicity and genotoxicity—ethanolic extract of *C.sylvestris*

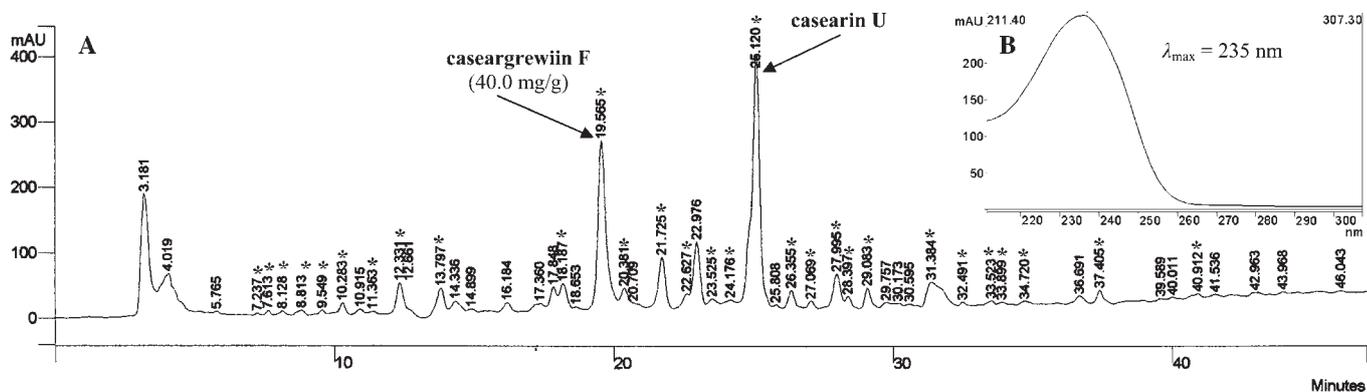
The results of the mutagenicity test in mouse bone marrow (MN test) and the genotoxicity test in mouse peripheral blood cells (comet assay) for ethanolic extract of *C.sylvestris* are shown in Table I. Mutagenicity and genotoxicity were observed at 50 and 75 mg/kg (both  $P < 0.01$ ). The ratio between PCEs and NCEs did not show statistically significant variation, indicating that there was no cytotoxic effect on mouse bone marrow cells.

#### Antimutagenicity and antigenotoxicity of ethanolic extract of *C.sylvestris*

Table II shows the protective effect of the ethanolic extract from *C.sylvestris* against inducible DNA damage in mouse blood cells through the MN test and comet assay. Since Tween 20 (20%) was used to dissolve the ethanolic extract, in the vehicle control this solution was administered before the CP to ensure that it has no influence on the antimutagenic effect of the test group. Consequently, there is no difference between Tween 20 (20%) plus CP and positive control. When the protective effect was evaluated by the MN test, an antimutagenic effect was observed in mice treated with 6.25 ( $P < 0.01$ ) and 12.5 mg/kg ( $P < 0.05$ ). However, the ethanolic extract of *C.sylvestris* did not reduce the DNA damage to the basal level. In the comet assay, the ethanolic extract from *C.sylvestris* significantly reduced the % DNA in tail at concentrations of 3.13 ( $P < 0.01$ ), 6.25 ( $P < 0.01$ ), 12.5 ( $P < 0.05$ ) and 25 mg/kg ( $P < 0.05$ ).

#### Mutagenicity and genotoxicity—caseargrewiin F

The results of the mutagenicity test in mouse bone marrow (MN test) and the genotoxicity test in mouse peripheral blood cells (comet assay) of ethanolic extract of *C.sylvestris* are shown in Table III. Clastogenicity and primary damage were observed at 3.8 mg/kg b.w. of caseargrewiin F (both  $P < 0.05$ )



**Fig. 2.** Results from HPLC-DAD analysis. (A) Chromatogram of extract from the leaves of *Casearia sylvestris*; asterisk (\*) indicates peaks with UV spectrum similar to casearins and caseargrewiina F. (B) Caseargrewiin F UV spectrum.

**Table I.** Mutagenic and genotoxic effects of ethanolic leaf extract of *Casearia sylvestris* assessed by micronucleus test and Comet assay in mouse blood cells

Treatment	N	Micronucleus test		Comet assay
		MN (%) Mean ± SE	PCE/NCE Mean ± SE	% DNA in tail Mean ± SE
Negative control	8	0.58 ± 0.06	0.95 ± 0.06	3.93 ± 0.45
Positive control	8	1.31 ± 0.12**	0.97 ± 0.15	9.91 ± 0.60*
Tween 20 (20%)	8	0.39 ± 0.04	0.83 ± 0.05	3.65 ± 0.43
<i>C.sylvestris</i> (mg/kg b.w.)				
3.13	8	0.35 ± 0.06	0.84 ± 0.09	3.89 ± 0.32
6.25	8	0.32 ± 0.06	0.99 ± 0.12	3.26 ± 0.32
12.5	8	0.56 ± 0.09	0.95 ± 0.60	3.85 ± 0.39
25	8	0.44 ± 0.06	1.16 ± 0.05	3.38 ± 0.41
50	8	0.98 ± 0.028*	1.10 ± 0.13	9.12 ± 0.51**
75	8	1.27 ± 0.14*	0.94 ± 0.16	13.26 ± 0.75**

N, number of animals; MN, micronuclei; SE, standard error. Mann-Whitney U test compared to negative control \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

**Table II.** Antimutagenic/antigenotoxic effects of ethanolic leaf extract of *Casearia sylvestris* assessed by micronucleus test and comet assay in mouse blood cells

Treatment	N	Micronucleus test		Comet assay
		MN (%) Mean ± SE	PCE/NCE Mean ± SE	% DNA in tail Mean ± SE
Negative control	7	0.34 ± 0.05	0.81 ± 0.10	3.37 ± 0.17
Positive control	7	1.13 ± 0.08**	0.93 ± 0.11	10.04 ± 0.27**
Tween 20 (20%) plus CP	6	0.94 ± 0.14**	0.84 ± 0.07	10.63 ± 0.40**
<i>C.sylvestris</i> (mg/kg b.w.) plus CP				
3.13	8	1.13 ± 0.23**	0.69 ± 0.09	5.97 ± 0.28* <sup>b</sup>
6.25	8	0.80 ± 0.07* <sup>b</sup>	0.84 ± 0.10	5.05 ± 0.27* <sup>b</sup>
12.5	8	0.75 ± 0.09* <sup>b</sup>	0.74 ± 0.07	6.32 ± 0.32** <sup>a</sup>
25	8	1.19 ± 0.16**	0.78 ± 0.11	6.02 ± 0.47** <sup>a</sup>
50	8	0.91 ± 0.13**	0.80 ± 0.09	9.07 ± 0.54*
75	8	0.93 ± 0.19**	0.92 ± 0.10	17.94 ± 0.46**

N, number of animals; MN, micronuclei; SE, standard error; CP, cyclophosphamide (50 mg/kg b.w.). Mann-Whitney U test compared to negative control \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and compared to Tween 20 (20%) plus CP <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01.

in, respectively, the MN test and comet assay. The parameter used to assess genotoxicity by comet assay was % DNA in tail. The ratio between PCEs and NCEs did not show statistically significant variation, indicating that caseargrewiin F was not cytotoxic to mouse bone marrow cells.

*Antimutagenicity and antigenotoxicity of caseargrewiin F*

The antimutagenesis/antigenotoxicity assays were performed to determine if caseargrewiin F protects DNA from inducible damage (CP, 50 mg/kg b.w.). Table IV shows the protective effect of caseargrewiin F against inducible DNA damage in mouse blood cells through the MN test and comet assay. In the positive control, water was administered before CP, in order to maintain the same conditions as in the test groups (gavage intake) while determining the DNA damage induced by the CP without protection. To verify that Tween 80 has no influence on the antimutagenic effect in the test group, we administered the emulsifying solution before the CP. The negative control was used to check basal levels of DNA damage. The

**Table III.** Mutagenic and genotoxic effects of caseargrewiin F assessed by micronucleus test and Comet assay in mouse blood cells

Treatment	N	Micronucleus test		Comet assay
		MN (%) Mean ± SE	PCE/NCE Mean ± SE	% DNA in tail Mean ± SE
Negative control	8	0.41 ± 0.13	0.97 ± 0.07	3.64 ± 0.32
Positive control	8	0.93 ± 0.22**	0.88 ± 0.04	10.44 ± 0.45**
Vehicle control	8	0.41 ± 0.07	1.00 ± 0.09	3.59 ± 0.27
Caseargrewiin F (mg/kg b.w.)				
0.16	8	0.39 ± 0.05	1.22 ± 0.11	3.78 ± 0.22
0.32	8	0.43 ± 0.09	1.11 ± 0.16	3.44 ± 0.22
0.63	8	0.4 ± 0.06	0.99 ± 0.06	3.01 ± 0.25
1.3	8	0.44 ± 0.06	1.15 ± 0.06	3.34 ± 0.23
2.5	8	0.39 ± 0.07	0.84 ± 0.04	3.29 ± 0.27
3.8	8	0.51 ± 0.17*	0.99 ± 0.12	9.59 ± 0.30**

N, number of animals; MN, micronuclei; SE, standard error. Mann-Whitney U test compared to negative control \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

**Table IV.** Antimutagenic/antigenotoxic effects of DNA damage by caseargrewiin F assessed by micronucleus test and comet assay in mouse blood cells

Treatment	N	Micronucleus test		Comet assay
		MN (%) Mean ± SE	PCE/NCE Mean ± SE	% DNA in tail Mean ± SE
Negative control	8	0.32 ± 0.07	0.72 ± 0.06	3.81 ± 0.22
Positive control	8	0.93 ± 0.11**	0.84 ± 0.12	12.22 ± 0.60**
Tween 80 (6%) plus CP	8	0.90 ± 0.11**	0.86 ± 0.11	12.84 ± 0.54**
Caseargrewiin F plus CP (mg/kg b.w.)				
0.16	8	0.78 ± 0.09**	0.91 ± 0.12	12.19 ± 0.55**
0.32	8	0.59 ± 0.13*	0.71 ± 0.08	12.61 ± 0.79**
0.63	8	0.71 ± 0.10**	0.77 ± 0.12	5.88 ± 0.22* <sup>b</sup>
1.3	8	0.66 ± 0.09**	1.03 ± 0.12	5.46 ± 0.55* <sup>b</sup>
2.5	8	0.70 ± 0.09**	0.64 ± 0.10	8.61 ± 0.33** <sup>b</sup>
3.8	8	0.65 ± 0.10**	0.83 ± 0.05	12.68 ± 0.42**

N, number of animals; MN, micronuclei; SE, standard error; CP, cyclophosphamide (50 mg/kg b.w.). Mann-Whitney U test compared to negative control \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and compared to Tween 20 (20%) plus CP <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01.

caseargrewiin F did not show a statistically significant protective effect when assessed by the MN test. However, in the comet assay, it significantly reduced the % DNA in tail at concentrations of 0.63 (P < 0.01), 1.3 (P < 0.01) and 2.5 (P < 0.01) mg/kg b.w.

**Discussion**

Previously, natural products have been used in popular medicine to treat several diseases without any knowledge about how harmful these compounds may be to human health. Recently, several studies have been conducted to evaluate the mutagenicity and genotoxicity of these natural products (19–21).

In the present study, distinct assays were performed to reveal whether the ethanolic extracts of *C.sylvestris* and caseargrewiin F were mutagenic and or genotoxic. The results presented here demonstrated that the extract was genotoxic and mutagenic at highest concentrations in comet assay and MN test (50 and 75 mg/kg b.w.). Caseargrewiin F was both mutagenic and

genotoxic at the highest dose of 3.8 mg/kg b.w. A similar result was obtained in a recent study that describes mutagenic and genotoxic activity at high concentrations of another clerodane diterpene assessed by the MN test and comet assay (22). Considering that comet assay detects genomic lesions that are susceptible to DNA repair while MN test reveals more drastically lesions in chromosome level (23), it is important to realize that the two highest concentrations of ethanolic extract of *C.sylvestris* and at the high concentration caseargreiiin F induced unrepairable DNA damage. A mutagenic effect of the ethanolic extract of *C.sylvestris* and caseargreiiin F could represent a potential antitumour property, as previous works on *C.sylvestris* demonstrated strong antitumour activity against Sarcoma 180 ascites in mice (17) and its casearins (clerodane diterpenes) exhibited a strong cytotoxic activity against V-79 tumour cells (18).

Interestingly, in the comet assay, the ethanolic extract of *C.sylvestris* was more efficient at preventing primary DNA damage at low concentrations (3.13 and 6.25 mg/kg b.w.). The molecules with non-mutagenic and/or antimutagenic properties could have antioxidant properties and, sometimes, may activate DNA repair pathways (24). They may act directly on the mutagenic process, by increasing the fidelity in DNA replication (desmutagens) or by stimulating DNA damage error-free repair (bio-antimutagenesis) (25). Additionally, ethanolic extract of *C.sylvestris* did not presented a dose-dependent response in both comet assay and MN test, and this result can be affected by various associated factors such as dependence of the effect of the substance on dose, the complexity of the test organism and the influence of simultaneous metabolic routes and enzymatic pathways (26). Caseargreiiin F was not antimutagenic when assessed by the MN test, but showed an antigenotoxic dose-dependent response in the comet assay over the range of 0.63–2.5 mg/kg b.w. (Table IV).

In accordance with the present work, previous study has demonstrated that essential oil of *C.sylvestris* has clastogenicity and anticlastogenicity in HTC cell line (27). Monoterpenes and sesquiterpenes were identified in the essential oil (28) whereas in the present study, sesquiterpenes and clerodane diterpenes were identified in the ethanolic extract. Among 15 sesquiterpenes identified in the ethanolic extract, 13 were previous identified in essential oil (11,28). The mutagenic and genotoxic activity as well as the protective effect of the ethanolic extract of *C.sylvestris* could be related to the sesquiterpenes. Additionally, there are recent studies that describe sesquiterpenes as chemopreventive (27,29). However, we cannot exclude the potential biological effects of the clerodane diterpenes since caseargreiiin F protected DNA from primary damage. Moreover, the use of mice instead of cell lines to assess protective effect of ethanolic extract could better verify absorption and metabolism of *C.sylvestris* in a complex organism.

Recently, natural products have been described to protect DNA from damage and cause DNA damage (30,31) as observed in the ethanolic extract of *C.sylvestris* and caseargreiiin F. Similar results were obtained in earlier studies and described these products as Janus compounds, referring to the mythological Roman god Janus, who had two faces in the same: one looking forward and the other backward (32). Comet assay also revealed that *C.sylvestris* exhibited chemoprotective effects, but was not able to reduce the levels of DNA damage to negative controls values. Other studies suggested similar

effects. Santos and Takahashi (33) demonstrated that selenomethionine, a selenium-derived antioxidant compound, was both genotoxic and antigenotoxic and reduced the levels of doxorubicin-induced DNA damage, but not to values as low as the negative control.

Cytotoxic events could lead to overestimation of the chemoprotective effects observed here. Thus, it is also important to consider that *C.sylvestris* and caseargreiiin F did not exhibit cytotoxic effects alone neither in combination with the CP as observed in the PCE/NCE values. Likewise, the chemoprotective effects can be considered only in the concentrations that did not exhibit genotoxic effects, a recommendation of the publication of Zeiger (34). Thus, our results demonstrate that the benefits of using ethanolic extract of *C.sylvestris* and caseargreiiin F as DNA protective compounds could be respectively safe at doses <50 mg/kg b.w. and 3.8 mg/kg b.w.

We conclude that the ethanolic extract of *C.sylvestris* and caseargreiiin F protects DNA against damage in low concentrations, which was carefully estimated by using MN test and comet assay. Keeping in mind that the same ethanolic extract and caseargreiiin F also can cause DNA damage in high concentrations.

## Funding

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2005/58472-9) to A.M.d.O.; Biota-FAPESP (2003/02176-7) to V.S.B; Bioprospecta (2004/07932-7) to D.H.S.S.; Conselho Nacional de Desenvolvimento a Pesquisa (305615/2006-8) to C.P.S.

## Acknowledgements

We wish to thank Maximino Antonio Boschi, Marcos Aparecido Dangona and Maria Izabel Feliciano for the excellent technical assistance.

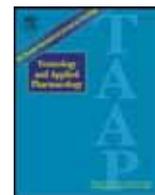
Conflict of interest statement: None declared.

## References

- González-Avila, M., Arriaga-Alba, M., de la Garza, M., del Carmen Hernández Pretelín, M., Domínguez-Ortiz, M. A., Fattel-Fazenda, S. and Villa-Treviño, S. (2003) Antigenotoxic antimutagenic and ROS scavenging activities of a *Rhoeo discolor* ethanolic crude extract. *Toxicol. In Vitro*, **17**, 77–83.
- Huang, Q., Lu, G., Shen, H. M., Chung, M. C. and Ong, C. N. (2007) Anticancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Med. Res. Rev.*, **27**, 609–630.
- Chase, M. W., Zmartzty, S., Lledó, M. D., Wurdack, K. J., Swensen, S. M. and Fay, M. F. (2002) When in doubt put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcl* DNA sequences. *Kew Bull.*, **57**, 141–181.
- Basile, A. C., Sertié, J. A. A., Panizza, S., Oshiro, T. T. and Azzolini, C. A. (1990) Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: preventive antiulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *J. Ethnopharmacol.*, **30**, 185–197.
- Borges, M. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M. *et al.* (2000) Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A<sub>2</sub>. *Comp. Biochem. Physiol.*, **127B**, 21–30.
- Sertié, J. A. A., Carvalho, J. C. T. and Panizza, S. (2000) Antiulcer activity of the crude extract from leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharm. Biol.*, **38**, 112–119.
- Orbelies, N. H., Burgess, J. P., Navarro, H. A. *et al.* (2002) Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J. Nat. Prod.*, **65**, 95–99.

8. Esteves, I., Souza, I. R., Rodrigues, M. *et al.* (2005) Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J. Ethnopharmacol.*, **101**, 191–196.
9. Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. and Buayairaksa, M. (2007) Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiiifolia*. *J. Nat. Prod.*, **70**, 1122–1126.
10. Santos, A. G., Ferreira, P. M. P., Vieira Júnior, G. M. *et al.* (2009) Casearin U its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. *Chem. Biodivers.*, in press.
11. Adams, R. P. (1995) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
12. Azevedo, L., Gomes, J. C., Stringheta, P. C., Gontijo, A. M. M. C., Padovani, C. R., Ribeiro, L. R. and Salvadori, D. M. F. (2003) Black bean (*Phaseolus vulgaris* L) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 1671–1676.
13. Schmid, W. (1975) The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9–15.
14. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**, 184–191.
15. Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunbord, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewsky, M., Smith, C. C. and Štětina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, **23**, 143–151.
16. Espindola, L. S., Vasconcelos, J. J. R., De Mesquita, M. L., Marquie, P., De Paula, J. E., Mambu, L. and Santana, J. M. (2004) Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var *lingua*. *Planta Med.*, **70**, 1093–1095.
17. Itokawa, H., Totsuka, N., Morita, H., Takeda, E., Iitaka, Y., Schenkel, E. P. and Motidome, M. (1988) Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae) structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1585–1588.
18. Morita, H., Takeya, K., Schenkel, E. P., Motidome, M., Kojima, M., Nakayama, H. and Itokawa, M. (1991) Structures and cytotoxic activity relationship of casearins new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 693–697.
19. Barcelos, G. R., Shimabukuro, F., Maciel, M. A. and Cólus, I. M. (2007) Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L) in V79 cells. *Toxicol. In Vitro*, **21**, 1468–1475.
20. Sannomiya, M., Cardoso, C. R., Figueiredo, M. E. *et al.* (2007) Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A Juss leaf extracts. *J. Ethnopharmacol.*, **112**, 319–326.
21. Sowemimo, A. A., Fakoya, F. A., Awopetu, I., Omobuwajo, O. R. and Adesanya, S. A. (2007) Toxicity and mutagenic activity of some selected Nigerian plants. *J. Ethnopharmacol.*, **113**, 427–432.
22. Cavalcanti, B., C., Costa-Lotufo, L. V. *et al.* (2006) Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 388–392.
23. Scolastici, C., Lima, R. O. A., Barbisan, L. F., Ferreira, A. L., Ribeiro, D. A. and Salvadori, D. M. (2008) Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicol. In Vitro*, **22**, 510–514.
24. Feig, D. I., Sowers, L. C. and Loeb, L. A. (1994) Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 6609–6613.
25. De Flora, S. (1998) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **402**, 151–158.
26. Fährig, R. (1996) Antimutagenic agents are also co-recombinogenic and can be converted to co-mutagens. *Mutat. Res.*, **350**, 59–67.
27. Iranshahi, M., Sahebkar, A., Konoshima, T. and Tokuda, H. (2009) Cancer chemopreventive activity of prenylated coumarin, umbelliprenin, *in vivo*. *Eur. J. Cancer Prev.*, **18**, 412–415.
28. Sousa, F. G., Schneider, N. F. Z., Mendes, C. E., de Moura, N. F., Denardin, R. B. N., Matuo, R. and Mantovani, M. S. (2007) Clastogenic and anticlastogenic effect of the essential oil from *Casearia sylvestris* Swart. *J. Essent. Oil Res.*, **19**, 376–378.
29. Ong, T. P., Heidor, R., de Conti, A., Dagli, M. L. and Moreno, F. S. (2006) Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis*, **27**, 1194–1203.
30. Mersch-Sundermann, V., Baborun, T., Stahl, T. *et al.* (2006) Assessment of the DNA damaging potency and chemopreventive effects towards BaP-induced genotoxicity in human derived cells by *Monimiastrum globosum* an endemic Mauritian plant. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 1427–1434.
31. Tavares, D. C., Mazzaron, B. G. R., Silva, L. F., Tonin, C. C. C. and Bastos, J. K. (2006) Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 1154–1158.
32. Zeiger, E. (2003) Illusions of safety: antimutagens can be mutagens and anticarcinogens can be carcinogens. *Mutat. Res.*, **543**, 191–194.
33. Santos, R. A. and Takahashi, C. S. (2008) Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage *in vitro* in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 671–677.
34. Zeiger, E. (2007) What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? *Mutat. Res.*, **626**, 1–3.

Received on July 8, 2009; revised on August 14, 2009;  
accepted on August 17, 2009



## Chemopreventive activity of compounds extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) Sw against DNA damage induced by particulate matter emitted by sugarcane burning near Araraquara, Brazil

A.M. Prieto<sup>a</sup>, A.G. Santos<sup>e</sup>, A.R. Csipak<sup>a</sup>, C.M. Caliri<sup>a</sup>, I.C. Silva<sup>a</sup>, M.A. Arbex<sup>b</sup>, F.S. Silva<sup>c</sup>, M.R.R. Marchi<sup>c</sup>, A.J. Cavalheiro<sup>d</sup>, D.H.S. Silva<sup>d</sup>, V.S. Bolzani<sup>d</sup>, C.P. Soares<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UNESP – Univ. Estadual Paulista, College of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical Analysis, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Araraquara, Brazil

<sup>b</sup> UNIFESP – Federal University of São Paulo, Paulista College of Medicine, Department of Internal Medicine, Rua Pedro de Toledo, 720, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> UNESP – Univ. Estadual Paulista, Chemistry Institute, Department of Analytical Chemistry, Rua Francisco Degni, S/N, Araraquara, Brazil

<sup>d</sup> UNESP – Univ. Estadual Paulista, Chemistry Institute, Department of Organic Chemistry, Rua Francisco Degni, S/N, Araraquara, Brazil

<sup>e</sup> UNESP – Univ. Estadual Paulista, College of Pharmaceutical Sciences, Department of Natural Principles and Toxicology, Rodovia Araraquara-Jau, km 01, Araraquara, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 July 2012

Revised 8 September 2012

Accepted 8 September 2012

Available online 13 September 2012

#### Keywords:

Total suspended particulate

Sugarcane burning

Chemoprevention

DNA damage

*Casearia sylvestris*

### ABSTRACT

Ethanol extract of *Casearia sylvestris* is thought to be antimutagenic. In this study, we attempted to determine whether this extract and casearin X (a clerodane diterpene from *C. sylvestris*) are protective against the harmful effects of airborne pollutants from sugarcane burning. To that end, we used the *Tradescantia* micronucleus test in meiotic pollen cells of *Tradescantia pallida*, the micronucleus test in mouse bone marrow cells, and the comet assay in mouse blood cells. The mutagenic compound was total suspended particulate (TSP) from air. For the *Tradescantia* micronucleus test, *T. pallida* cuttings were treated with the extract at 0.13, 0.25, or 0.50 mg/ml. Subsequently, TSP was added at 0.3 mg/ml, and tetrads from the inflorescences were examined for micronuclei. For the micronucleus test in mouse bone marrow cells and the comet assay in mouse blood cells, Balb/c mice were treated for 15 days with the extract—3.9, 7.5, or 15.0 mg/kg body weight (BW)—or with casearin X—0.3, 0.25, or 1.2 mg/kg BW—after which they received TSP (3.75 mg/kg BW). In *T. pallida* and mouse bone marrow cells, the extract was antimutagenic at all concentrations tested. In mouse blood cells, the extract was antigenotoxic at all concentrations, whereas casearin X was not antimutagenic but was antigenotoxic at all concentrations. We conclude that *C. sylvestris* ethanolic extract and casearin X protect DNA from damage induced by airborne pollutants from sugarcane burning.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Unlike fossil fuels, alternative fuels such as ethanol are considered environmentally friendly. In Brazil, the use of biofuels, described as clean alternatives to oil, has improved the air quality in major urban centers. However, biomass burning in regions of sugarcane cultivation, where the crops are burned in order to facilitate harvesting and increase the yield per ton (Zamperlini et al., 2000), large amounts of smoke and soot that falls on nearby cities, as well as producing

huge clouds of particles and toxic gases that are released into the atmosphere (Andrade et al., 2010; Silva et al., 2010). Those airborne particles have been shown to be mutagenic and can also cause significant alterations in respiratory mechanics and lung histology (Andrade et al., 2011; Goto et al., 2011; Mazzoli-Rocha et al., 2008; Umbuzeiro et al., 2008a).

A wide variety of natural products are currently being evaluated in terms of their chemopreventive properties, which could counter the harmful effects of mutagenic compounds present in the environment (Kang et al., 2010; Kaur et al., 2010). *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) is a tropical tree, commonly known as “guaçatonga” in Brazil, that is widely used for its healing, anti-inflammatory, and anti-ulcer properties (Borges et al., 2000; Sertié et al., 2000; Esteves et al., 2005). Phytochemical investigations reveal that the major compounds isolated from *C. sylvestris*, including clerodane diterpenes, exhibit both cytotoxic and antifungal activities (Carvalho-Oliveira et al., 2005; Orbelies et al., 2002; Santos et al., 2010). In addition, recent assays of the ethanolic leaf extract

**Abbreviations:** TSP, total suspended particulate; BW, body weight; DCM, dichloromethane; MeOH, methanol; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; DL, detection limit; QL, quantitation limit; PCEs, polychromatic erythrocytes; NCEs, normochromatic erythrocytes.

\* Corresponding author at: College of Pharmaceutical Sciences, UNESP, R. Expedicionários do Brasil, 1621, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil. Fax: +55 16 3322 0073.

E-mail address: [soarescp@hotmail.com](mailto:soarescp@hotmail.com) (C.P. Soares).

of *C. sylvestris* and caseargrewiin F (a clerodane diterpene within the extract) have demonstrated that those substances are antimutagenic at low concentrations (Oliveira et al., 2009). The aim of the present study was to determine whether the ethanolic leaf extracts of *C. sylvestris* and casearin X protect cells against total suspended particulate (TSP)-induced DNA damage.

## Materials and methods

### TSP sampling

In the city of Araraquara, Brazil, 24-h TSP samples were collected over two 10-day periods in 2003—first in March and then in September—the latter being during the sugarcane burning season. The samples were collected with a high-volume sampler (Handi-vol; Energética, Rio de Janeiro, Brazil) operating at an average flow rate of  $1.1\text{--}1.7\text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ , positioned 4 m above the ground and protected from the rain, at a sampling site in a suburban area. The city of Araraquara (located at  $21^\circ 48' 11''$  S,  $48^\circ 08' 25''$  W, with a population of approximately 200,000) is situated in the so-called “sugarcane belt”, a region in the middle of the state of São Paulo that is responsible for most of the sugarcane production in Brazil. The closest sugarcane crop was approximately 5 km from the sampling site. Particles were collected on fiberglass filters (Energética), which were dried for 24 h at  $50^\circ\text{C}$ , before and after particle collection, for weighing. The filters were then stored at  $4^\circ\text{C}$  until analysis.

### TSP organic fractions

Each filter was cut in small pieces and extracted with dichloromethane (DCM):methanol (MeOH) at 4:1 (v/v) in separate Erlenmeyer flasks. The flasks containing the DCM:MeOH and filter strips were ultrasonicated for 10 min at 40 Hz, and the resulting solution was passed through a  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  filter (Corning Glass Works, Corning, New York, USA). The filtrate was concentrated to 5 ml in a rotary evaporator at  $40^\circ\text{C}$ , after which it was dried under a gentle flow of nitrogen. Finally, the resulting organic fraction residue was dissolved in DMSO, and a solution of  $0.3\text{ mg/ml}$  was prepared in saline, with DMSO at 1%.

### Chromatographic analysis of TSP organic fractions

High performance liquid chromatography was carried out with a Varian ProStar system, with a model 230 controller pump, model 400 automatic injector, and model 360 fluorescence detector (Varian, Palo Alto, California, USA). The external standard plot method, involving triplicate injections of standard solutions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), was used in order to construct the analytical curves for each PAH. The detection limit (DL) and quantitation limit (QL) for each PAH, calculated as recommended by the International Union of Pure and Applied Chemistry (Currie, 1999), are shown in Table 1. All PAHs generated linear analytical curves with an  $R^2 > 0.99$ . Chromatography was performed under the following conditions: on a polymeric column (Supelcosil LC-PAH,  $25\text{ cm} \times 4.6\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ; Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA); with an acetonitrile:water gradient elution beginning at 40% acetonitrile (for 5 min) and increasing to 100% acetonitrile over 20 min, remaining for an additional 15 min in this last condition; at a flow rate of  $1.5\text{ ml/min}$ ; at an injection volume of  $30\text{ }\mu\text{l}$ ; with detection at  $\lambda_{\text{ex}} 240\text{ nm}$  (for all PAHs, except [1,2,3-cd]pyrene:  $\lambda_{\text{ex}} 300\text{ nm}$ ) and  $\lambda_{\text{em}} 398\text{ nm}$  (for all PAHs, except [1,2,3-cd]pyrene:  $\lambda_{\text{em}} 498\text{ nm}$ ). The presence of PAHs in the fraction was confirmed by gas chromatography.

### Plant material

Leaves of *C. sylvestris* Swartz (Salicaceae) were collected, identified, and characterized phytochemically as described by Oliveira et al.

**Table 1**

High performance liquid chromatography with fluorescence detection for polycyclic aromatic hydrocarbons.

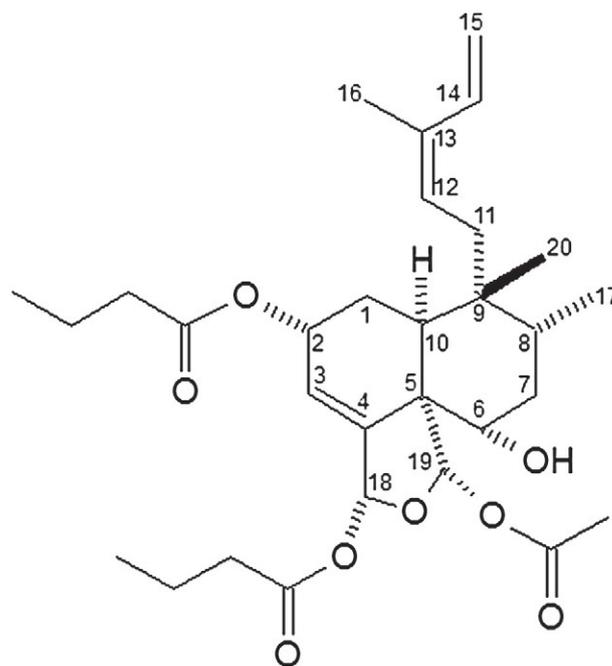
PAH	DL (pg)	QL (pg)
Anthracene	0.9	3.1
Benz[e]acephenanthrylene	3.6	12.1
Benzo[a]anthracene	5.7	18.9
Benzo[a]pyrene	10.2	34.0
Benzo[e]pyrene	3.4	11.4
Benzo[g,h,i]perylene	107.0	357.0
Benzo[k]fluoranthene	0.6	1.9
Chrysene	33.3	111.0
Dibenzo[a,h]anthracene	120.0	400.0
Fluoranthene	58.7	196.0
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	33.2	111.0
Phenanthrene	16.2	54.0
Pyrene	4.4	14.7

PAH, polycyclic aromatic hydrocarbons; DL, detection limit; QL, quantitation limit.

(2009). Casearin X (Fig. 1) was isolated from the extract as described by Santos et al. (2010). The purity of casearin X was determined using  $5.0\text{ mg}$  of casearin X dissolved in  $5.0\text{ ml}$  of methanol and filtered through PVDF membranes ( $0.45\text{ }\mu\text{m}$ ) prior to HPLC analysis. An aliquot of  $20\text{ }\mu\text{l}$  was injected onto Hypersil Gold® C18 column ( $250 \times 4.6\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ), which was eluted isocratically with a mixture of methanol and water 75:25 (v/v) for 60 min. The solvent flow rate was  $1.0\text{ ml/min}$ . Detection was at  $200\text{--}700\text{ nm}$ . The chromatographic purity of the casearin X was determined at  $235\text{ nm}$  as 97.0%. The chromatographic purity of the casearin X was 97.0% (HPLC-UV detected at  $235\text{ nm}$ ).

### Tradescantia micronucleus test

The *Tradescantia* micronucleus test is a simple and reliable assay and it was used to prescreen the ethanolic extract of *C. sylvestris* for a possible antimutagenic effect before the chemopreventive effect was assessed in mice. We performed the test as proposed by Ma (1981) with some modifications. Cuttings of flowering creeper *Tradescantia pallida* were immersed in Hoagland's solution for 24 h (Epstein,



**Fig. 1.** Chemical structure of casearin X.

1975), after which they were soaked in the extract for 4 h at one of three concentrations (0.13, 0.25, or 0.50 mg/ml), then treated with 0.3 mg/ml of TSP fraction. As a positive control, additional cuttings were first treated with Hoagland's solution and then with TSP solution (4 h). As a negative control, other cuttings were treated for 8 h with Hoagland's solution alone and, as a vehicle control, with Hoagland's solution (4 h), as well as with Tween 20 (20%, 4 h). After each treatment, the cuttings were allowed to recover for 24 h in Hoagland's solution; the young inflorescences were collected and fixed in a solution of acetic acid/ethanol (1:3). At least 10 cuttings were scored, and only preparations showing early tetrads were counted. The number of micronuclei in 300 tetrads per slide was counted at a magnification of  $\times 400$ , and the results are expressed as the percentage of micronuclei.

#### Mouse assays

**Animals.** Six-week-old Balb/c male mice were maintained in a temperature- and humidity-controlled environment ( $22 \pm 2$  °C;  $55 \pm 10\%$  humidity), on a 12/12 h light/dark cycle. Before the experiments, the animals were acclimatized for 1 week, during which time they had free access to a commercial diet (Purina®) and water. The study was approved by the Animal Research Ethics Committee of the São Paulo State University, College of Pharmaceutical Sciences (res. CEP/FCF/CAr no. 01/2006)

**Experimental design.** Mice were randomly assigned to 9 groups of 8 animals each. Group 1 (negative control) mice received only drinking water (0.6 ml/day by gavage) for 2 weeks before treatment with 0.9% saline solution by i.p. injection. Group 2 (positive control) mice also received only drinking water for 2 weeks but were treated on day 15 with i.p. injections of TSP at 3.75 mg/kg body weight (BW). Group 3 mice received 0.6 ml Tween 20 (20%) or Tween 80 (6%) by gavage, for 2 weeks, and were treated on day 15 with TSP (3.75 mg/kg BW, i.p. The mice in groups 4–9 were treated by gavage (0.6 ml/day) with solutions of ethanolic extract of *C. sylvestris* (3.9, 7.5, and 15.0 mg/kg BW; groups 4, 5, and 6, respectively) and casearin X (0.3, 0.6, and 1.2 mg/kg BW; groups 7, 8, and 9, respectively) for 2 weeks, all receiving i.p. injections of TSP (3.75 mg/kg BW) on day 15.

**Micronucleus test.** Mouse bone marrow was collected 24 h after TSP injection. The micronucleus test was carried out as described by Schmid (1975). All slides were stained with May–Grunwald Giemsa and coded to avoid observer bias. For each experimental result,

1000 polychromatic erythrocytes (PCEs, immature erythrocytes) were scored in order to determine the percentage of micronucleated PCEs. To assess cytotoxicity, the ratio of PCEs to normochromatic erythrocytes (NCEs, mature erythrocytes) was determined in 200 cells.

**Comet assay.** For the comet assay of mouse blood cells, the experimental design was the same as was that for the micronucleus test in mouse bone marrow. Peripheral blood was collected in heparinized capillary vials and kept on ice until use. In brief, 20  $\mu$ l of blood was homogenized with low-melting-point agarose, spread on a microscope slide pre-coated with normal-melting-point agarose, and coverslipped. The alkaline version of the comet assay (single cell gel electrophoresis) was performed as described by Singh et al. (1988). Duplicate slides were prepared and stained with ethidium bromide. We screened 50 cells per sample with a fluorescent microscope (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Germany) equipped with a 515–560 nm excitation filter, a 590 nm barrier filter, and a 40 $\times$  objective. The level of DNA damage was assessed with an image analysis system (TriTek CometScore, version 1.5; TriTek Corp., Sumerduck, Virginia, USA), and the tail moment was calculated.

#### Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the SigmaStat program, version 3.5 (Systat, Richmond, California, USA). The Kolmogorov–Smirnov test was used in order to determine the normal distribution of data in all assays. Because the data distribution was not normal, we used the non-parametric Mann–Whitney test and compared the test groups with the positive control (TSP). The Kruskal–Wallis test was used in order to assess the cytotoxicity in mouse bone marrow cells.

## Results and discussion

#### Compounds in organic fractions

Particulate PAH concentrations are summarized in Table 2. There was a clear difference between the burning season and the non-burning season in terms of the PAH content of the TSP. In the burning season, we detected specific PAHs derived from sugarcane burning. According to Simoneit (2002), the PAHs phenanthrene, fluoranthene, and pyrene, as well as, to a lesser extent, anthracene and benzo[a]anthracene, are emitted mainly during the burning of *Gramineae* species. In our study, there were high concentrations of the PAHs benz[e]acephenanthrylene, benz

**Table 2**  
Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in total suspended particulate collected in 2003 in Araraquara, Brazil and their genotoxic and carcinogenic effects.

PAH	Sugarcane season		WHO**		IARC***
	Non-burning	Burning	Genotoxicity	Carcinogenicity	
	(ng/m <sup>3</sup> )*	(ng/m <sup>3</sup> )*			
Anthracene	ND	4.11	–	–	3
Benz[e]acephenanthrylene	0.079	0.74	+	+	2B
Benzo[a]anthracene	ND	0.52	+	+	2B
Benzo[a]pyrene	NQ	3.24	+	+	1
Benzo[e]pyrene	ND	0.72	+	?	3
Benzo[g,h,i]perylene	ND	0.27	+	–	3
Benzo[k]fluoranthene	0.28	3.30	+	+	2B
Chrysene	ND	NQ	+	+	2B
Dibenz[a,h]anthracene	ND	NQ	+	+	2A
Fluoranthene	ND	1.29	+	+	3
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	ND	ND	+	+	2B
Phenanthrene	ND	0.53	NE	NE	3
Pyrene	0.10	1.34	(?)	–	3

PAH, polycyclic aromatic hydrocarbons; ND, not detected (under the detection limit); NQ, not quantitated (under the quantitation limit); NE, not evaluated.

\* Total suspended particulate obtained on 5 separate days.

\*\* WHO, 1998: +, positive; –, negative; ?, questionable; parentheses, result derived from a small database.

\*\*\* IARC, 2009: 1, carcinogenic to humans; 2A, probably carcinogenic to humans; 2B, possibly carcinogenic to humans; 3, not carcinogenic to humans.

**Table 3**

Preliminary antimutagenicity assay in meiotic pollen cells of *Tradescantia pallida* previously treated with ethanolic extract of *Casearia sylvestris* then treated with total suspended particulate obtained during the sugarcane burning season in 2003 in Araraquara, Brazil.

Treatments (mg/ml)	Micronuclei mean ± SE
Negative control	1.08 ± 0.37**
Organic TSP – 0.3	17.49 ± 2.53
CSE – 0.13 <sup>a</sup>	7.50 ± 3.38**
CSE – 0.25 <sup>a</sup>	6.92 ± 2.99**
CSE – 0.50 <sup>a</sup>	11.50 ± 5.81**

SE, standard error; TSP, total suspended particulate, CSE, *C. sylvestris* ethanolic extract.

\*\*  $p < 0.01$  vs. organic TSP (Mann–Whitney test with Dunn post-test).

<sup>a</sup> plus organic TSP (0.3 mg/ml).

[a]anthracene, benzo[a]pyrene, benzo[k]fluoranthene, fluoranthene, and indeno[1,2,3-cd]pyrene, all of which are considered genotoxic and carcinogenic (WHO, 1998; IARC, 2009), during the sugarcane burning season. There was also a high concentration of benzo[a]pyrene—3.24 ng/m<sup>3</sup>.

#### *Tradescantia micronucleus test*

In the *Tradescantia* micronucleus test, an antimutagenic effect was observed with ethanolic extract of *C. sylvestris* at 0.13, 0.25, and 0.50 mg/ml, all of which proved to protect against DNA damage induced by organic TSP collected during the sugarcane burning season (Table 3). It is known that plants such as *T. pallida* are good bioindicators of genotoxic agents, demonstrating whether a mutagen is potentially hazardous to human health (Ma, 1981; Carvalho-Oliveira et al., 2005; Leal et al., 2007). In fact, the *Tradescantia* micronucleus test was very useful here, as a screening test of the antimutagenic activity of the ethanolic extract, before we proceeded to the mouse assays.

#### *Chemoprotection of DNA in mouse blood cells by ethanolic extract of C. sylvestris and casearin X*

Table 4 shows that *C. sylvestris* ethanolic extract was able to reduce the DNA damage caused by TSP collected during the sugarcane burning season, in the micronucleus test and in the comet assay, whereas casearin X reduced only the DNA damage assessed by the comet assay (Table 5). Neither compound was cytotoxic to mouse bone marrow cells, as evidenced by the fact that the PCE/NCE ratio of the compounds was not statistically different from that of the negative control (Tables 4 and 5). The same profile was observed when we assessed the antimutagenicity of *C. sylvestris* ethanolic extract

**Table 4**

Antimutagenicity/antigenotoxicity of *C. sylvestris* ethanolic extract against DNA damage caused by total suspended particulate obtained during the sugarcane burning season in 2003 in Araraquara, Brazil.

Treatment (mg/kg BW)	TM mean ± SE	PCE/NCE mean ± SE	Micronuclei mean ± SE
Negative control	0.12 ± 0.07**	0.96 ± 0.03	1.00 ± 0.27**
20% Tween 20 <sup>a</sup>	2.85 ± 0.36	0.95 ± 0.12	5.53 ± 0.73
Organic TSP – 3.75	1.57 ± 0.36	0.99 ± 0.05	2.56 ± 0.40
CSE – 3.90 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.01**	1.07 ± 0.11	0.48 ± 0.16**
CSE – 7.50 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.04*	0.89 ± 0.07	0.50 ± 0.12**
CSE – 15.00 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.02**	0.99 ± 0.05	1.00 ± 0.37**

SE, standard error; TM, tail moment (comet assay); PCE, polychromatic erythrocyte; NCE, normochromatic erythrocyte; TSP, total suspended particulate; BW, body weight; CSE, *C. sylvestris* ethanolic extract.

<sup>a</sup> plus organic TSP (3.75 mg/kg BW).

\*  $p < 0.05$  vs. organic TSP (Mann–Whitney test with Dunn post-test).

\*\*  $p < 0.01$  vs. organic TSP (Mann–Whitney test with Dunn post-test).

**Table 5**

Antimutagenicity/antigenotoxicity of casearin X against DNA damage caused by total suspended particulate obtained during the sugarcane burning season in 2003 in Araraquara, Brazil.

Treatment (mg/kg BW)	TM mean ± SE	PCE/NCE mean ± SE	Micronuclei mean ± SE
Negative control	0.10 ± 0.03**	1.00 ± 0.01	0.37 ± 0.12**
Tween <sup>a</sup>	1.59 ± 0.38	1.02 ± 0.01	2.73 ± 0.36
Organic TSP – 3.75	1.44 ± 0.23	1.01 ± 0.04	2.23 ± 0.37
CSX – 0.30 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.02**	1.02 ± 0.02	1.60 ± 0.16
CSX – 0.60 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.05**	1.00 ± 0.02	2.23 ± 0.16
CSX – 1.20 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.11***	0.99 ± 0.01	2.20 ± 0.13

SE, standard error; TM, tail moment (comet assay); PCE, polychromatic erythrocyte; NCE, normochromatic erythrocyte; TSP, total suspended particulate, CSX, *C. sylvestris* casearin X.

<sup>a</sup> plus organic TSP (3.75 mg/kg BW).

\*\*  $p < 0.01$  vs. organic TSP (Mann–Whitney test with Dunn post-test).

\*\*\*  $p < 0.001$  vs. organic TSP (Mann–Whitney test with Dunn post-test).

and of casearegwiin F against cyclophosphamide, as previously reported by Oliveira et al. (2009). Considering that casearegwiin F and casearin X are clerodane diterpenes, these phytochemicals probably contribute to the DNA damage protection observed in ethanolic extract.

Cyclophosphamide also forms adducts with DNA (Mirkes et al., 1984), as do some PAHs in extractable TSP (Umbuzeiro et al., 2008b), which suggests that one possible mechanism of action of *C. sylvestris* ethanolic extract is the reduction of DNA adduct formation. One of the consequences of DNA adduct formation is the clastogenic effect. When a sample such as *C. sylvestris* ethanolic extract is able to decrease the number of micronuclei, it acts against irreparable DNA damage, which is manifested as chromosome aberrations or aneugenic effects, including clastogenicity (Scolastici et al., 2008). However, the comet assay detects primary DNA lesions that are repairable (Scolastici et al., 2008). In the present study, *C. sylvestris* ethanolic extract and casearin X both reduced the extent of such damage. Given that casearin X, a clerodane diterpene, did not reduce the percentage of micronuclei, another class of compounds must be responsible for this effect of *C. sylvestris* ethanolic extract. The essential oil of *C. sylvestris* has also been shown to protect DNA from clastogenic damage, having been found to contain monoterpenes and sesquiterpenes (Sousa et al., 2007). Oliveira et al. (2009) identified sesquiterpenes and clerodane diterpenes in the ethanolic extract of *C. sylvestris*. Of the 15 sesquiterpenes identified in the ethanolic extract, 13 had previously been identified in the essential oil (Esteves et al., 2005; Sousa et al., 2007). The protective effect of *C. sylvestris* ethanolic extract against irreparable DNA damage might be related also to its sesquiterpene content. In the present study, we observed that *C. sylvestris* ethanolic extract and casearin X have chemopreventive activity against DNA damage induced by TSP emitted from sugarcane burning. Our results suggest that *C. sylvestris* extract and diterpenes can act by different mechanisms to protect DNA against damage, including repairable and non-repairable damages.

#### Role of funding sources

This work was supported by grants from the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP, São Paulo Research Foundation; Grant no. 2005/58472-9 to A.M.P and Grant no. 2006/50892-1 to C.M.C.), from the *Biota-FAPESP Program* (Grant no. 2003/02176-7 to V.S.B.), from the *BIOProspecTA Program* (Grant no. 2004/07932-7 to D.H.S.S. and A.J.C.), and from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, National Council for Scientific and Technological Development; Grant no. 305615/2006-8 to C.P.S.; scholarship grants to A.R.C. and A.G.S.)

## Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgments

We would like to thank Maria Izabel Feliciano and Maximino Antonio Boschi for their excellent technical assistance.

## References

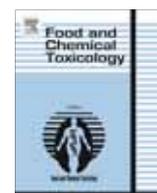
- Andrade, S.J., Cristale, J., Silva, F.S., Zocolo, G.J., Marchi, M.R.R., 2010. Contribution of sugar-cane harvesting season to atmospheric contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Araraquara city, Southeast Brazil. *Atmos. Environ.* 44, 2913–2919.
- Andrade, S.J., Varella, S.D., Pereira, G.T., Zocolo, G.J., Marchi, M.R.R., Varanda, E.A., 2011. Mutagenic activity of airborne particulate matter (PM<sub>10</sub>) in a sugarcane farming area (Araraquara city, Southeast Brazil). *Environ. Res.* 111, 545–550.
- Borges, M.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Andrião-Escarso, S.H., Diniz, H., Hamaguchi, A., Quintero, A., Lizano, S., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., Homs-Brandeburgo, M.I., 2000. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A<sub>2</sub>. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 127 (1), 21–30.
- Carvalho-Oliveira, R., Pozo, R.M., Lobo, D.J., Lichtenfels, A.J., Martins-Junior, H.A., Bustilho, J.O., Saiki, M., Sato, I.M., Saldiva, P.H., 2005. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo. *Environ. Res.* 98 (1), 1–7.
- Currie, L.A., 1999. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Anal. Chim. Acta* 391 (2), 105–126.
- Epstein, E., 1975. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. EDUSP/Livros técnicos e Científicos Editora S. A. São Paulo. p. 341.
- Esteves, I., Souza, I.R., Rodrigues, M., Cardoso, L.G., Santos, L.S., Sertie, J.A., Perazzo, F.F., Lima, L.M., Schneedorf, J.M., Bastos, J.K., Carvalho, J.C., 2005. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J. Ethnopharmacol.* 101 (1–3), 191–196.
- Goto, D.M., Lança, M., Obuti, C.A., Barbosa, C.M.G., Saldiva, P.H.N., Zanetta, D.M.T., Lorenzi-Filho, G., Santos, U.P., Nakagawa, N.K., 2011. Effects of biomass burning on nasal mucociliary clearance and mucus properties after sugarcane harvesting. *Environ. Res.* 111, 664–669.
- IARC. International Agency for Research on Cancer, 2009. Monographs on the Overall Evaluations of Carcinogenicity to humans. List of all agents, mixtures and exposures evaluated to date: IARC Monographs, 1, p. 100A.
- Kang, H.G., Jeong, S.H., Cho, J.H., 2010. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of methanol extracts of *Petasites japonicus* Maxim leaves. *J. Vet. Sci.* 11 (1), 51–58.
- Kaur, P., Chandel, M., Kumar, S., Kumar, N., Singh, B., Kaur, S., 2010. Modulatory role of alizarin from *Rubia cordifolia* L. against genotoxicity of mutagens. *Food Chem. Toxicol.* 48 (1), 320–325.
- Leal, C.S.T., Crispim, V.R., Frota, M., Kelecom, A., Da Silva, X.A., 2007. Use of a bioindicator system in the study of the mutagenetical effects in the neighborhoods of deposits of radioactive waste. *Appl. Radiat. Isot.* 66 (4), 535–538.
- Ma, T.-H., 1981. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environ. Health Perspect.* 37, 85–90.
- Mazzoli-Rocha, F., Magalhaes, C.B., Malm, O., Saldiva, P.H., Zin, W.A., Faffe, D.S., 2008. Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugar cane burning. *Environ. Res.* 108, 35–41.
- Mirkes, P.E., Greenaway, J.C., Rogers, J.G., Brundrett, R.B., 1984. Role of acrolein in cyclophosphamide teratogenicity in rat embryos in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72 (2), 281–291.
- Oliveira, A.M., Santos, A.G., Santos, R.A., Santos, A.G., Csapak, A.R., Olivato, C., Freitas, M.B., Bassi, C.L., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V.S., Silva, D.H.S., Sakamoto-Hojo, E.T., Takahashi, C.S., Soares, C.P., 2009. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. *Mutagenesis* 24 (6), 501–506.
- Orbelies, N.H., Burgess, J.P., Navarro, H.A., Pinos, R.E., Fairchild, C.R., Peterson, R.W., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Wani, M.C., Wall, M.E., 2002. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J. Nat. Prod.* 65 (2), 95–99.
- Santos, A.G., Ferreira, P.M.P., Vieira Júnior, G.M., Perez, C.C., Tininis, A.G., Silva, G.H., Bolzani, V.S., Costa-Lotuf, L.V., Pessoa, C. do O., Cavalheiro, A.J., 2010. Casearin X its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. *Chem. Biodivers.* 7 (1), 205–215.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31 (1), 9–15.
- Scolastici, C., Lima, R.O.A., Barbisan, L.F., Ferreira, A.L., Ribeiro, D.A., Salvadori, D.M., 2008. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicol. in Vitro* 22 (2), 510–514.
- Sertié, J.A.A., Carvalho, J.C.T., Panizza, S., 2000. Antiulcer activity of the crude extract from leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharm. Biol.* 38 (2), 112–119.
- Silva, F.S., Cristale, J., André, P.A., Saldiva, P.H.N., Marchi, M.R.R., 2010. PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>: the influence of sugarcane burning on potential cancer risk. *Atmos. Environ.* 44, 5133–5138.
- Simoneit, B.R.T., 2002. Biomass burning – a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. *Appl. Geochem.* 17, 129–162.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1), 184–191.
- Sousa, F.G., Schneider, N.F.Z., Mendes, C.E., De Moura, N.F., Denardin, R.B.N., Matu, R., Mantovani, M.S., 2007. Clastogenic and anticlastogenic effect of the essential oil from *Casearia sylvestris* Swart. *J. Essent. Oil Res.* 19, 376–378.
- Umbuzeiro, G.A., Franco, A., Magalhães, D., Castro, F.J.V., Kummrow, F., Rech, C.M., Carvalho, L.R.F., Vasconcelos, P.C., 2008a. A preliminary characterization of the mutagenicity of atmospheric particulate matter collected during sugar cane harvesting using the salmonella/microsome microsuspension assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 249–255.
- Umbuzeiro, G.A., Franco, A., Martins, M.H., Kummrow, F., Carvalho, L., Schmeiser, H.H., Leykauf, J., Stiborova, M., Claxton, L.D., 2008b. Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil. *Mutat. Res.* 625 (1), 72–80.
- WHO. World Health Organization, 1998. Environmental health criteria 202: selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. IPCS, International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva.
- Zamperlini, G.C., Santiago-Silva, M., Vilegas, W., 2000. Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionisation mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.* 889, 281–286.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)



## Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae)

Aline M. Prieto<sup>a</sup>, André G. dos Santos<sup>b</sup>, Ana Paula S. Oliveira<sup>c</sup>, Alberto J. Cavalheiro<sup>d</sup>, Dulce H.S. Silva<sup>d</sup>, Vanderlan S. Bolzani<sup>d</sup>, Eliana Ap. Varanda<sup>c</sup>, Christiane P. Soares<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, School of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical Analysis, Rua Expedicionários do Brasil 1621, Araraquara, SP, Brazil

<sup>b</sup>UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, School of Pharmaceutical Sciences, Department of Natural Principles and Toxicology, Rodovia Araraquara-Jaú km 01, Araraquara, SP, Brazil

<sup>c</sup>UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, School of Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, Araraquara, SP, Brazil

<sup>d</sup>UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Chemistry Institute, Rua Prof. Francisco Degni, s/n, Araraquara, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 September 2012

Accepted 17 November 2012

Available online xxx

#### Keywords:

*Casearia sylvestris*

Ames test

Comet assay

Casearin B

Antioxidant

DCFDA

### ABSTRACT

Studies have shown that *Casearia sylvestris* compounds protect DNA from damage both *in vitro* and *in vivo*. Complementarily, the aim of the present study was to assess the chemopreventive effect of casearin B (CASB) against DNA damage using the Ames test, the comet assay and the DCFDA antioxidant assay. The genotoxicity was assessed by the comet assay in HepG2 cells. CASB was genotoxic at concentrations higher than 0.30  $\mu\text{M}$  when incubated with the FPG (formamidopyrimidine-DNA glycosylase) enzyme. For the antigenotoxicity comet assay, CASB protected the DNA from damage caused by  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the HepG2 cell line in concentrations above 0.04  $\mu\text{M}$  with post-treatment, and above 0.08  $\mu\text{M}$  with pre-treatment. CASB was not mutagenic (Ames test) in TA 98 and TA 102. In the antimutagenicity assays, the compound was a strong inhibitor against aflatoxin B1 (AFB) in TA 98 (>88.8%), whereas it was moderate (42.7–59.4%) inhibitor against mytomicin C (MMC) in TA 102. Additionally, in the antioxidant assay using DCFDA, CASB reduced reactive oxygen species (ROS) generated by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . In conclusion, CASB was genotoxic to HepG2 cells at high concentrations; was protective of DNA at low concentrations, as shown by the Ames test and comet assay; and was also antioxidant.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Casearia sylvestris* is a plant commonly known in Brazil as “guaçatonga,” and its leaves are widely used for their anti-inflammatory and anti-ulcerative activities (Basile et al., 1990; Borges et al., 2000; Sertié et al., 2000). In addition, the bark of *C. sylvestris* has been used to treat fever symptoms and for treatment of herpes virus and diarrhea (Esteves et al., 2005). Phytochemical investigations revealed that the major compounds isolated from *C. sylvestris* (clerodane diterpenes) exhibited anti-fungal activities (Oberlies et al., 2002).

**Abbreviations:** 2-AF, 2-aminofluorene; 2-AN, 2-anthramine; AFB, aflatoxin B1; CASB, casearin B; DCFDA, dichlorodihydrofluorescein diacetate; FPG, formamidopyrimidine-DNA glycosylase; HPLC-UV, High-performance liquid chromatography-ultraviolet; IR, infrared; LPCC, low-pressure column chromatography; MMC, mytomicin C; MS, mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; NPD, 4-nitro-o-phenylenediamine; SPE, solid-phase extraction; TLC, thin layer chromatography.

\* Corresponding author. Address: UNESP, School of Pharmaceutical Sciences, Rua Expedicionários do Brasil 1621, 14 801 902 Araraquara, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 16 33015706; fax: +55 16 33220073.

E-mail address: [soarescp@hotmail.com](mailto:soarescp@hotmail.com) (C.P. Soares).

Extracts and chemical components of *C. sylvestris*, particularly clerodane diterpenes, showed cytotoxic activity against tumor cells. Specifically to the casearin B (CASB), there is only one published study concerning its biological activity, which assessed the cytotoxicity of the sample against human cell lines using MTT assay. The study presents the following CASB cytotoxicity results: MOLT-4 (leukemia;  $\text{IC}_{50} = 0.22 \mu\text{M}$ ), MDA-MB-435 (melanoma;  $\text{IC}_{50} = 0.35 \mu\text{M}$ ), HCT-8 (colon cancer;  $\text{IC}_{50} = 0.97 \mu\text{M}$ ), and SF-295 (glioblastoma;  $\text{IC}_{50} = 0.43 \mu\text{M}$ ), whereas CASB was less cytotoxic to L-929 cells (normal fibroblasts;  $\text{IC}_{50} = 1.52 \mu\text{M}$ ) demonstrating a more selective cytotoxic response to tumor cell lines (dos Santos et al., 2010). However, there are no further mechanistic investigations concerning these results.

Regarding the effects of *C. sylvestris* compounds on DNA, studies have reported the absence of genotoxic activity of an ethanolic extract from the leaves of *C. sylvestris* in HTC (hepatoma) and V79 cells (Chinese hamster lung cells) using comet assays (Maistro et al., 2004). Additionally, the essential oil of the leaves was anti-clastogenic when evaluated by observing chromosome aberrations in HTC cells (Sousa et al., 2007). Recently, a study using mouse blood cells showed that an ethanolic extract and caseargrewin F

protected DNA from damage in low concentrations and were genotoxic and mutagenic in high concentrations (de Oliveira et al., 2009).

In fact, currently, there are a range of studies that investigate compounds isolated from plants that protect DNA from damage, elucidating the possible mechanisms by which these reductions in DNA damage occur. To complement the previous studies performed with *C. sylvestris* compounds, the aim of the present study was to assess the chemopreventive effect of CASB using the comet assay, the Ames test and an antioxidant assay.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), antibiotic–antimycotic solution, kanamycin sulfate, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (CAS # 298-93-1), dimethylsulfoxide (DMSO) (CAS # 67-68-5), formaldehyde (CAS # 50-00-0), mitomycin C (MMC) (CAS # 50-07-7), 2-aminofluorene (2-AF) (CAS # 153-78-6), 4-nitro-*o*-phenylenediamine (NPD) (CAS # 99-56-9), 2-anthramine (2-AN) (CAS # 613-13-8) and aflatoxin B1 (AFB) were purchased from Sigma–Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA). Fetal calf serum (FCS) was obtained from Cultilab® (Campinas, São Paulo, BRA). Sterile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CAS # 7722-84-1), ethanol (CAS # 64-17-5), silica (CAS # 7631-86-9), hexane (CAS # 110-82-7), ethyl acetate (CAS # 141-78-6) and isopropanol (CAS # 67-63-0) were purchased from Merck® (Darmstadt, Hessen, DEU). Doxorubicin (Dox) (CAS # 23214-92-8) was purchased from Eurofarma® (São Paulo, BRA). FPG endonuclease was purchased from New England Biolabs® (Ipswich, MA, USA). S9 mixture was obtained from Moltox® (Boone, NC, USA). Activated charcoal was purchased from Synth® (Diadema, São Paulo, BRA).

### 2.2. Preparation of extract, and purification and structure determination of CASB

Dried and powdered leaves of *C. sylvestris* (20.5 kg) were extracted with ethanol in a stainless steel extractor with solvent re-circulation for 24 h at 40 °C. The crude extract was concentrated under reduced pressure to yield 1540.0 g of dry residue. A portion (473.6 g) of the residue was separated by SPE (solid-phase extraction) from silica (60–200 µm)/activated charcoal (1:1, w/w) by elution with hexane/ethyl acetate (95:5, v/v), ethyl acetate, and methanol to afford three fractions (SPE1–SPE3). SPE2 (16.0 g) was submitted to normal-phase LPCC (low-pressure column chromatography) over silica (40–63 µm) eluted with a gradient of hexane/ethyl acetate/isopropanol of increasing polarity (78:20.5:1.5 to 60:37.3:2.7, v/v): 45 fractions were collected and monitored by TLC (thin layer chromatography), HPLC–UV (High-performance liquid chromatography–ultraviolet), and <sup>1</sup>H NMR (nuclear magnetic resonance). Fractions 15–19 were submitted to preparative reversed-phase HPLC (C18 column; 250 × 50 mm; 12 µm) with methanol/ water mixture (67:33 or 75:25, v/v) as the mobile phase to yield CASB (250.6 mg), Fig. 1. The compound was identified by spectrometric analysis using NMR, MS (mass spectrometry), IR (infrared) and UV, as described by dos Santos et al. (2010).

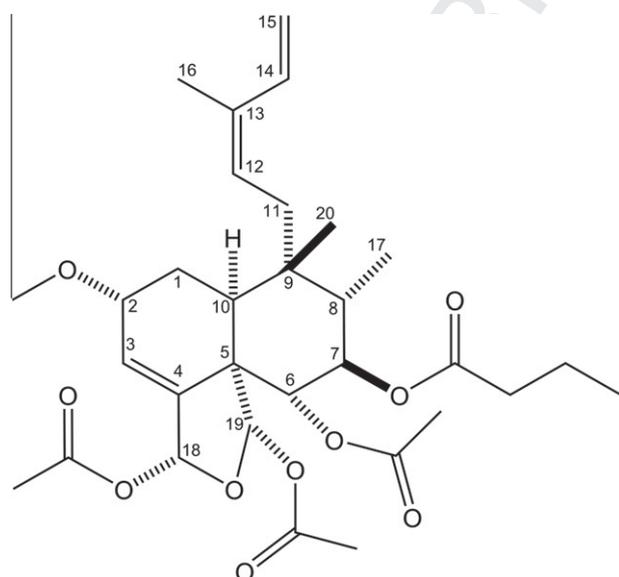


Fig. 1. Chemical structure of CASB.

### 2.3. Cell culture

The HepG2 cell line was purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil. Because this cell line was obtained from a human hepatocellular carcinoma, there are studies showing that it can express hepatic enzymes such as lipase, reductase and catalase (Busch et al., 1990; Cuthbert et al., 1997), leading to a protective effect against promutagens (Wilkening et al., 2003), making it a good model to test antioxidant properties. Additionally, HepG2 cell line showed to be highly sensitive toward several genotoxicants that give negative results in other *in vitro* assays such as mycotoxins (Knasmüller et al., 2004a), becoming a very suitable tool for genotoxicity testing (Knasmüller et al., 2004b). Additionally, there are no studies concerning if CASB is a phase I/II inducer, which makes HepG2 more suitable to test CASB since there are studies that show that HepG2 cell line is sensitive to both phase I and II inducers genotoxicants (Majer et al., 2004). The cells were grown in 75 cm<sup>3</sup> flasks (Techno Plastic Products®, Trasadingen, CHE) with loosened caps, containing DMEM supplemented with 10% FCS (v/v), antibiotic–antimycotic Solution (1000 U of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin sulfate and 0.25 µg/mL amphotericin B), and kanamycin sulfate (100 µg/mL) at 37 °C in a CO<sub>2</sub> incubator (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) under a humidified atmosphere composed of 5% CO<sub>2</sub> in 95% air.

### 2.4. Viability

As proposed by Tice et al. (2000), the comet assay must be performed in conditions of low cytotoxicity; consequently the genotoxicity and antigenotoxicity of the HepG2 cells were assessed under the IC<sub>20</sub> obtained from the MTT assay. The antimutagenicity was assessed under non-cytotoxic conditions using the Ames test, as previously performed in *Salmonella typhimurium* strains.

#### 2.4.1. MTT assay

For the MTT assay, 10<sup>4</sup> cells/well were seeded in a 96 well plate, then the cells were exposed to at least five different concentrations of CASB compounds for a period of 24 h in triplicate, for three independent experiments. The treatments were: (1) negative control (DMEM), (2) positive control (Dox at 15 µg/mL), (3) vehicle control (DMEM plus DMSO 0.05% (v/v)), (4) five different concentrations of CASB (0.65–10.00 µM). After the treatments, the MTT assay was performed as described by Mosmann (1983). Finally, the viability was obtained using the following formula: viability (%) = (treatments × 100)/(negative control).

#### 2.4.2. Viability in

*S. typhimurium* First, the culture medium, bacteria (TA98 or TA102), sterile physiological solution and the compound to be tested were homogenized by vortexing. Subsequently, the mixture was added to tubes with 9 mL of sterile physiological solution to obtain a dilution of 1:10, which was homogenized, and a final volume of 1 mL was transferred to another tube with the same amount of physiological solution; this procedure was repeated to obtain a dilution of 10<sup>-5</sup>. From the tube containing a dilution of 10<sup>-5</sup>, 0.1 mL was seeded on nutrient agar plates, then incubated for 24 h at 37 °C. After this period, the colonies were counted and the colony-forming units/mL was calculated (CFU = colonies × dilution × 10). The percentage of viability for each treatment was compared to the number of colonies from the negative control. According to Vargas et al. (1993), cytotoxicity was considered for samples with a percentage of viability below 60%.

### 2.5. Comet assay

#### 2.5.1. Genotoxicity

HepG2 cells were seeded in 24-well plates (5 × 10<sup>4</sup> cells/well) and treated for 24 h with five concentrations of CASB using 1:2 dilution ratio. The treatments for the comet assay were performed to allow the cells to complete at least one entire cell cycle (24 h); in this way, it was possible to assess the damages that the cells were not able to repair. The CASB concentrations tested were: 0.15, 0.30, 0.60, 1.20 and 2.30 µM. DMEM plus 0.05% DMSO and 0.5% Hank's solution (v:v) was used as vehicle control (VC); for the negative control (NC), the cells were treated only with DMEM; and for the positive control, the cells were treated with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. The concentration of hydrogen peroxide was obtained by absorbance as proposed by Brestel (1985). After the treatments, the cells were detached, re-suspended and homogenized with low-melting-point agarose, spread on a microscope slide pre-coated with normal-melting-point agarose and covered with a coverslip. Then, the slides were incubated for 30 min with 90 µL of FPG enzyme (1:3000, v:v) at 37 °C, to specifically assess the oxidative damage in the DNA (Collins et al., 2008). Additionally, an experiment without FPG incubation was also performed. The alkaline version of the comet assay (single cell gel electrophoresis) was performed as described by Singh et al. (1988). Duplicate slides were prepared and stained with ethidium bromide, and 50 cells were screened per sample with a fluorescent microscope (ZEISS®, Jena, Thuringia, DEU) equipped with an excitation filter of 515–560 nm, a barrier filter of 590 nm and a 40× objective. The level of DNA damage was assessed by an image analysis system (TriTek CometScore® 1.5, 2006, Sumerduck, VA, USA), and the DNA percent in the tail was obtained for each

191 treatment. The groups treated with the compounds were compared with the vehicle  
192 control using the Kruskal–Wallis test and the associated Dunn post-test using the  
193 OriginPro 8.0 software (OriginLab®, Northampton, MA, USA).

### 2.5.2. Antigenotoxicity

194 HepG2 cells were pre-treated with CASB and were then exposed to 1 mM of  
195 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min, or the cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM for 10 min and post-treat-  
196 ed with the CASB. Five concentrations were tested: 0.02, 0.04, 0.08, 0.15 and  
197 0.30 μM. The positive control consisted of treating with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) for 10 min,  
198 and the cells were pre- or post-treated with DMEM, negative control (DMEM)  
199 and vehicle control (cells pre- or post-treated with 0.05% DMSO plus Hank's 0.5%  
200 in DMEM plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM)). Subsequently, the comet assay was performed as pre-  
201 viously described for the genotoxicity assay, incubating the slides with FPG enzyme  
202 (1:3000, v:v) because the mutagen used in this test was H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Statistical analysis  
203 was performed using the Kruskal–Wallis test and the associated Dunn post-test  
204 to compare the treated groups with the vehicle control group using the OriginPro  
205 8.0 software (OriginLab®, Northampton, MA, USA). The damage inhibition percent  
206 (I) was calculated as proposed by Hosseinimehr and Karami (2005):  $I = [(Positive$   
207  $control) - (Test)] \times 100 / (Positive\ control)$ . Additionally, the percentage of  
208 inhibition was classified as strong (higher than 60%), moderate (60–41%), weak  
209 (40–21%) and negligible (20–0%) (Calomme et al., 1996).

### 2.6. Ames test

#### 2.6.1. Mutagenicity

211 Mutagenicity was evaluated by the *Salmonella*/microsome assay that is based  
212 on the plate-incorporation method proposed by Maron and Ames (1983), using *S.*  
213 *typhimurium* test strains TA98 and TA102, provided by Dr. B.N. Ames (Berkeley,  
214 CA, USA), both with and without metabolization by the S9 mixture. The test strains  
215 were obtained from frozen cultures and were grown overnight for 12–14 h at 37 °C  
216 in oxid nutrient broth No. 2. The CASB was dissolved in DMSO and added to 2 mL  
217 of top agar mixed with 100 μL of bacterial culture ( $1-2 \times 10^8$  cells/mL) and were  
218 then added to a plate with minimal agar. Then, the plates were incubated at  
219 37 °C for 48 h and the number of His<sup>+</sup> revertant colonies was manually counted.  
220 Additionally, the influence of metabolic activation was assessed by adding 500 μL  
221 of S9 mixture (S9 at a concentration of 0.04 mL/mL of mix). All experiments were  
222 analyzed in triplicate. The standard mutagens used as positive controls in each  
223 experiment were: TA 102 (–S9) MMC (0.5 μg/plate), TA 102 (+S9) 2-AF (10 μg/  
224 plate), TA 98 (–S9) NPd (10 μg/plate), TA98 (+S9) 2-AN (1.25 μg/plate). DMSO  
225 was used as the negative (vehicle) control (100 μL – maximum volume that was  
226 used in the assay). We selected the concentrations based on the toxicity. In a pre-  
227 liminary test, we considered toxicity to be when we observed either a reduction  
228 in the number of his<sup>+</sup> revertants, or an alteration in the auxotrophic background  
229 (i.e., background lawn). In all subsequent assays, the upper limit of the dose range  
230 tested was the highest nontoxic dose or the lowest toxic dose determined in this  
231 assay. In the mutagenicity assay, we used the following concentrations: 0.03;  
232 0.05; 0.10, 0.15 and 0.21 mg/plate. Statistical analysis was performed using the Sal-  
233 anal software (Integrate Laboratory Service, NC, USA, 1992), adopting the Bernstein  
234 et al. (1982) model. The mutagenic index (MI) was also calculated for each dose;  
235 that is, the average number of revertants per plate divided by the average number  
236 of revertants per plate in the negative (solvent) control. A sample was considered  
237 positive when MI ≥ 2 for at least one of the tested doses, and there was a reproduc-  
238 ible dose–response curve (Valent et al., 1993; Varella et al., 2004).

#### 2.6.2. Antimutagenicity

242 Before assessing the antimutagenicity, the cytotoxicity of the highest dose of  
243 the compounds associated with the mutagen was tested. Based on the results of this  
244 preliminary assay, the *C. sylvestris* components were tested in non-cytotoxic doses  
245 for their antimutagenic properties. The procedures for the antimutagenicity assays  
246 were similar to those described for the mutagenicity assays, except that in each  
247 tube of top agar containing the bacterial strain and the CASB, the mutagenic agent  
248 was also added. One of the mutagens tested was a direct-acting genotoxic com-  
249 pound, MMC in TA 102 ( $4 \times 10^{-7}$  mg/plate); while the other was the indirect-acting  
250 promutagen AFB in TA 98 ( $5 \times 10^{-7}$  mg/plate). In addition to AFB, the promutagen-  
251 activating fraction S9 was added. This fraction was prepared and used following  
252 Maron and Ames (1983). Toxicity to the various bacteria was also tested, and the  
253 sample concentrations employed for the antimutagenic test were all found to be  
254 non-toxic. The following CASB concentrations were used in the antimutagenicity  
255 assay: 0.02; 0.03; 0.05; 0.10 mg/plate. The concentration of CASB that inhibits  
256 50% of mutagenicity (MID<sub>50</sub>) was obtained using regression analysis (OriginPro  
257 8.0 software – OriginLab®, Northampton, MA, USA). The calculation of the  
258 percentage of mutagenic inhibition (I) was carried out as described by Tachino  
259 et al. (1994). We also classified the mutagenic inhibition as described in antigeno-  
260 toxicity assay.

$$I = [1 - (\text{revertants per plate with inhibitor} / \text{revertants per plate without inhibitor})] \times 100$$

### 2.7. Antioxidant assay

265 The intracellular reactive oxygen species (ROS) were measured using 2',7'-  
266 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA). Inside the cell, DCFDA (inactive  
267 ROS) is converted to DCFH (active ROS) by an esterase. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and other ROS oxidize  
268 intracellular DCFH (non-fluorescent) to DCF (fluorescent). HepG2 cells ( $10^4$  cells/  
269 well) were seeded in sterile black plates. Then, the cells were treated with CASB  
270 in three concentrations: 0.04, 0.08 and 0.15 mM for 24 h with their respective con-  
271 trols. The concentrations of this compound were chosen based on previously ob-  
272 tained results of cytotoxicity and genotoxicity assays. Additionally, the following  
273 controls were used for the experiment: (1) negative control (NC) cells (cells main-  
274 tained in culture medium), (2) vehicle control (VC) (cells treated with 0.05% DMSO  
275 plus Hank's 0.5% in DMEM) and (3) quercetin (a natural antioxidant) control (Q)  
276 (40 mM). After treatment, the wells were washed twice with Hank's solution. Next,  
277 100 μL of a solution of 5 mM DCFDA diluted in Hank's was added and incubated for  
278 30 min at 37 °C while protected from light. Thereafter, 1 mM hydrogen peroxide  
279 was added for 10 min, after which time the hydrogen peroxide was removed from  
280 the plate by aspiration. The wells were washed twice with Hank's, and 100 μL of  
281 Hank's solution was added to each well for reading with a fluorimeter. Reading  
282 was performed every minute for 30 min, at excitation:  $\lambda = 485$  nm, emission:  
283  $\lambda = 528$  nm. A curve of fluorescence intensity versus time was plotted, and from this  
284 curve, the total fluorescence intensity for each treatment was estimated by obtain-  
285 ing the integral of each curve (area under the curve) using the OriginPro 8.0 soft-  
286 ware (OriginLab®, Northampton, MA, USA). Three independent experiments were  
287 performed in triplicate. Next, a one-way analysis of variance (ANOVA) was per-  
288 formed with the Dunnett post-test to compare the total intensities obtained from  
289 the treatments versus the vehicle control (VC) (Nakajima et al., 2009).

## 3. Results

### 3.1. Viability and genotoxicity

291 Before the effect of the compounds on the DNA in the HepG2  
292 cell line was assessed, the MTT assay was performed. The assays  
293 were conducted under the IC<sub>20</sub>, 2.3 μM (Fig. 2). Complementarily,  
294 the results, shown in Fig. 2, demonstrate that this compound was  
295 genotoxic to HepG2 cells at concentrations above 0.30 μM when  
296 incubated with FPG enzyme, whereas without the enzyme incuba-  
297 tion, CASB begins to show genotoxicity at 1.15 μM (Fig. 3).

### 3.2. Antigenotoxicity

299 To assess antigenotoxicity, concentrations that slightly affected  
300 the cell viability and that were not genotoxic were chosen. CASB  
301 significantly reduced the DNA damage caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HepG2  
302 cells in both pre- (0.08 and 0.15 μM) and post-treatments (0.04,  
303 0.08 and 0.15 μM) (Fig. 4A). With regard to the percent inhibition  
304 of DNA damage (Fig. 4B), the post-treatment was the most effi-  
305

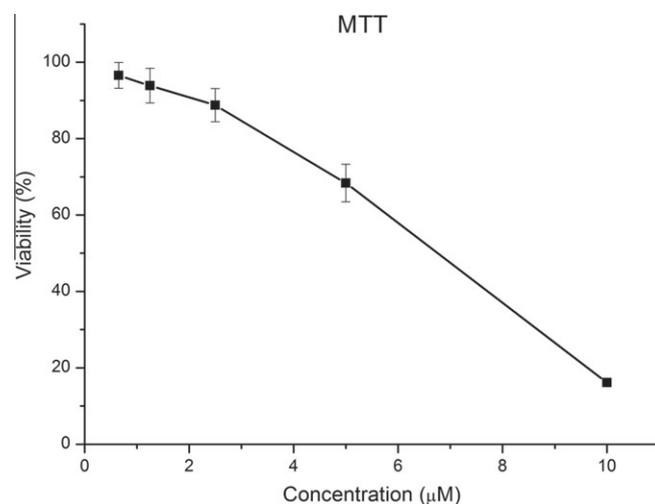
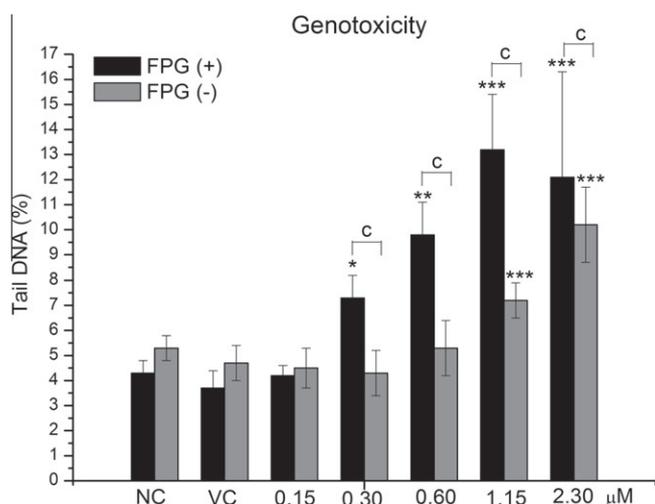


Fig. 2. MTT viability assay of CASB in the HepG2 cell line treated with the compound for 24 h. IC<sub>20</sub> = 1.15 μM.



**Fig. 3.** Genotoxicity in the HepG2 cell line exposed to CASB for 24 h assessed by the comet assay, with and without incubation with FPG enzyme. NC = negative control (cells in cell culture medium, DMEM); VC = vehicle control (cells treated with DMSO 0.05%, Hank's 0, 5% in DMEM). Kruskal–Wallis with Dunn post-test VC versus treatments: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Mann–Whitney FPG(+) versus FPG(-):  $^{\circ}p < 0.001$ .

in the strain TA 98 under metabolization (+S9) and in the strain TA 102 without metabolization (–S9). The combination of CASB (0.10 mg/plate) with the mutagens AFB and MMC resulted in a viability of 100% and 69%, respectively, which are acceptable to perform the antimutagenicity assay. Under metabolization using the strain TA 98, CASB was a strong inhibitor (approximately 90%) against DNA damage induced by AFB. For the strain TA 102 without metabolization, CASB was a weak (40–21%) or moderate (41–60%) inhibitor against the mutagenicity induced by MMC.

### 3.5. Antioxidant assay

The results of the antioxidant assay (Fig. 5) show that CASB was able to significantly reduce ROS generated by  $H_2O_2$  at the two higher concentrations tested (0.08 and 0.15  $\mu M$ ) compared with the vehicle control (Fig. 5B). These results corroborate the  $H_2O_2$  DNA damage reduction shown in the post-treatment with CASB assessed by the comet assay, as shown in Fig. 4A.

## 4. Discussion

The present study assessed the mutagenic/genotoxic, antimutagenic/antigenotoxic and antioxidant activities of CASB in *S. typhimurium* and HepG2 cell lines. Recently, natural products have been suggested to possess DNA protective and antioxidant properties (Dellai et al., 2009; Gupta et al., 2009), which can be useful to prevent diseases such as cancer.

The *S. typhimurium* strains TA 98 and TA 102 were used in the Ames test. The TA 98 strain has a specific deletion in the plasmid pKM 101 that makes this strain reversible in frameshift events (Maron and Ames, 1983). *S. typhimurium* TA 102 is susceptible to oxidative damage due to a mutation in the gene *G428* (Levin et al., 1982).

CASB was not mutagenic to the strains TA 98 and TA 102. As described previously, these results indicate that the compound did not induce significant frameshift events or oxidative damage at the concentrations tested.

However, CASB was genotoxic at concentrations below the  $IC_{20}$  to the HepG2 cells. Interestingly, when the enzyme FPG was used, the genotoxicity increased significantly compared to the assay

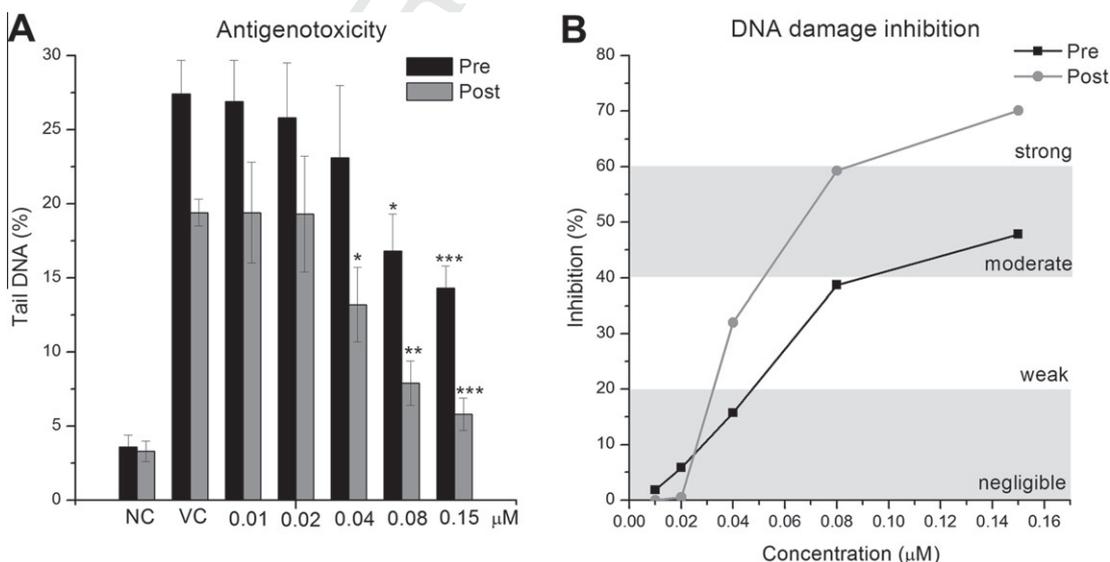
cient, presenting strong inhibition (70.1%) in the higher concentration tested (0.15  $\mu M$ ). At the same concentration, the pre-treatment exhibited moderate inhibition (47.8%).

### 3.3. Mutagenicity

Table 1 shows that CASB was not mutagenic to *S. typhimurium* strains TA 98 and TA 102 with and without metabolization. That the mutagenic index was  $<2$  demonstrates that the compound tested could not induce an increase in the number of revertants.

### 3.4. Antimutagenicity

The results of the antimutagenicity assay for CASB are shown in Table 2. The compound was used in association with MMC and AFB



**Fig. 4.** (A) Antigenotoxicity in the HepG2 cell line both pre- and post-treated with CASB for 24 h against the damage caused by  $H_2O_2$  (1 mM), which was assessed by the comet assay and incubated with FPG enzyme. NC = negative control (cells in cell culture medium, DMEM); VC = vehicle control (cells pre- or post-treated with DMSO 0.05%, Hank's 0, 5% in DMEM and exposed to  $H_2O_2$ ). Kruskal–Wallis with Dunn post-test VC versus treatments: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . (B) Inhibition of  $H_2O_2$  DNA damage by the antigenotoxicity treatment described in A. Negligible (20–0%), weak (40–21%), moderate (60–41%) and strong (higher than 60%).

**Table 1**Mutagenic activity of CASB in strains of *S. typhimurium* TA 98 and TA 102 in the presence (+S9) and absence (–S9) of metabolization.

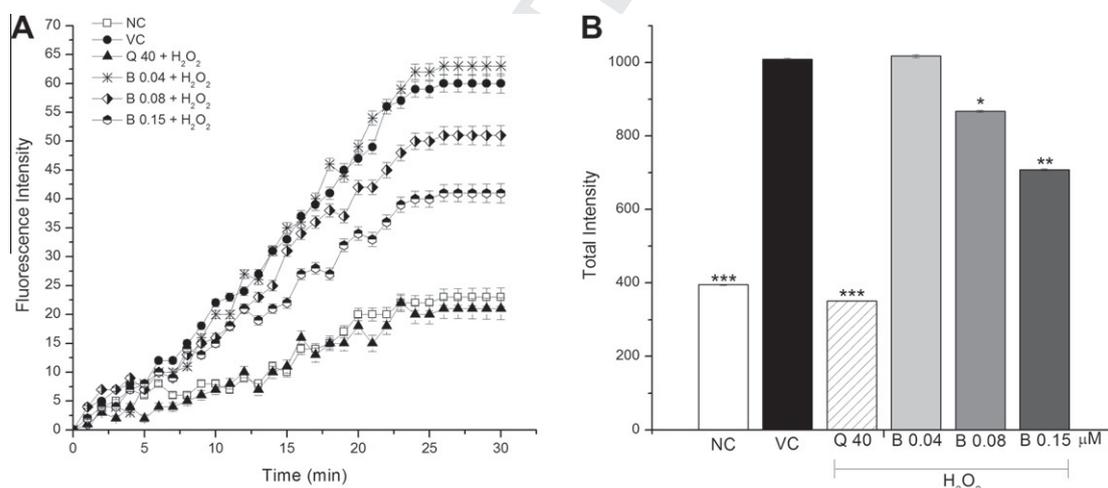
mg/plate	<i>Salmonella typhimurium</i> revertants/plate $\pm$ SD (MI)			
	TA 98		TA 102	
	–S9	+S9	–S9	+S9
DMSO	71.0 $\pm$ 5.6	70.3 $\pm$ 11.2	208.0 $\pm$ 14.4	317.3 $\pm$ 20.2
0.03	78.3 $\pm$ 10.3 (1.1)	76.0 $\pm$ 16.2(1.1)	211.3 $\pm$ 54.3 (1.0)	284.3 $\pm$ 3.1 (0.9)
0.05	74.7 $\pm$ 15.1 (1.1)	94.3 $\pm$ 19.9 (1.3)	217.0 $\pm$ 23.5 (1.0)	296.0 $\pm$ 24.3 (0.9)
0.10	76.0 $\pm$ 12.1 (1.1)	79.0 $\pm$ 24.4 (1.1)	188.3 $\pm$ 34.1 (0.9)	273.7 $\pm$ 13.8 (0.9)
0.15	77.7 $\pm$ 20.5 (1.1)	94.3 $\pm$ 9.3(1.3)	179.0 $\pm$ 24.6 (0.9)	297.7 $\pm$ 35.3 (0.9)
0.21	59.3 $\pm$ 7.4 (0.8)	88.7 $\pm$ 2.1 (1.3)	193.3 $\pm$ 33.7 (0.9)	260.7 $\pm$ 41.4 (0.8)
Control +	1749.3 $\pm$ 152.5	460.0 $\pm$ 20.0	1438.3 $\pm$ 160.3	371 $\pm$ 35.7

MI = Mutagenesis index; SD = standard deviation; Control +: TA 102 (–S9) MMC (0.5  $\mu$ g/plate), TA 102 (+S9) 2-AF (10  $\mu$ g/plate), TA 98 (–S9) NPD (10  $\mu$ g/plate), TA98 (+S9) 2-AN (1.25  $\mu$ g/plate). DMSO (100  $\mu$ L/plate) = negative control.

**Table 2**Antimutagenicity assay. *S. typhimurium* revertants per plate treated with CASB in association with mitomycin C (MMC) and aflatoxin B1 (AFB) in strain TA 98 under metabolization (+S9) and strain TA 102 without metabolization (–S9).

<i>Salmonella typhimurium</i> revertants/plate $\pm$ SD (I)			
TA 98 (+S9) mg/plate		TA 102 (–S9) mg/plate	
AFB ( $5 \times 10^{-7}$ )	349.7 $\pm$ 0.6	MMC ( $4 \times 10^{-7}$ )	690.7 $\pm$ 90.9
DMSO	30.3 $\pm$ 3.1	DMSO	209.3 $\pm$ 10.1
CASB + AFB ( $5 \times 10^{-7}$ )		CASB + MMC ( $4 \times 10^{-7}$ )	
0.02	34.3 $\pm$ 4.5 (90.2) <sup>d</sup>	0.02	650.7 $\pm$ 101.9 (5.8) <sup>a</sup>
0.03	39 $\pm$ 6 (88.8) <sup>d</sup>	0.03	364 $\pm$ 31.4 (47.3) <sup>c</sup>
0.05	33.3 $\pm$ 2.5 (90.5) <sup>d</sup>	0.05	395.7 $\pm$ 47.2 (42.7) <sup>c</sup>
0.1	35.7 $\pm$ 1.5 (89.8) <sup>d</sup>	0.1	280.7 $\pm$ 4.2 (59.4) <sup>c</sup>

I = percent inhibition; SD = standard deviation; CASB = CASB; DMSO (100  $\mu$ L/plate) = negative control; I = <sup>a</sup>negligible (20–0%), <sup>b</sup>weak (40–21%), <sup>c</sup>moderate (60–41%) and <sup>d</sup>strong (higher than 60%); MID<sub>50</sub> = concentration of CASB (mg/plate) that inhibits 50% of mutagenicity.



**Fig. 5.** Antioxidant activity using DCFDA in the HepG2 cell line pre-treated for 24 h with CASB against ROS generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) Curve of fluorescence intensity obtained in 30 min of reaction. (B) Total intensity obtained by the integral of the curves presented in A. NC = negative control (cells in cell culture medium, DMEM); VC = vehicle control (cells pre-treated with DMSO 0.05%, Hank's 0.5% in DMEM and exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Q = quercetin control (40  $\mu$ M). B 0.04 = CASB 0.04  $\mu$ M. B 0.08 = CASB 0.08  $\mu$ M. B 0.15 = CASB 0.15  $\mu$ M. Kruskal–Wallis with Dunn post-test VC versus treatments: \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001.

without enzyme incubation (Fig. 3). Thus, CASB itself caused oxidative damage to DNA with a concentration–response profile. Although this mechanism has not been elucidated for CASB, de Carvalho et al. (1998) demonstrated that two different diterpene clerodanes extracted from *C. sylvestris*, known as casearins S and T, caused acetylation of the DNA molecule when measured by DNA damage detection in cells of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. Therefore, the interactions of casearins with DNA may be associated with the genotoxic effects observed in this study.

Additionally, Zeiger (2007) notes that DNA damage protection studies have to be conducted in parallel with mutagenicity and cytotoxicity assays to guarantee their safety and avoid overestimation of the chemopreventive effects observed, respectively. Thus, our DNA damage protection studies were performed using non-cytotoxic and non-genotoxic/mutagenic conditions.

Compounds that protect DNA from damage can act by two different mechanisms. They can be considered desmutagens, which reduce the mutagenic/genotoxic effect by directly interacting with

the mutagens, block their effects by inhibiting their metabolic activation or enhance their detoxification. The pre-treatment is commonly performed to assess the detoxificant properties of the compounds, since detoxificant enzymes can be induced during the pre-treatment period. Alternatively, these compounds can be classified as bioantimutagens, which promote DNA repair after damage, increase DNA replication, inhibit error-prone replication or suppress the growth and replication of cells with damaged DNA. The post-treatment is useful to assess bioantimutagenic effects, for instance DNA repair response can be activated after damage, and the post-treatment can help to improve this effect (Kada and Shimoi, 1987). The results obtained for CASB are interesting because in the antigenotoxicity assay in the HepG2 cell line, CASB protected the DNA against oxidative damage at lower concentrations with both pre- and post-treatment (Fig. 4). Additionally, the compound also protected the DNA against oxidative damage in TA102 when exposed to MMC (Table 2).

Taken together, the data shown in the genotoxicity and antigenotoxicity assays are particularly interesting. They corroborate previous results obtained in animal models for compounds from *C. sylvestris*, where a weak genotoxic response and an antigenotoxic activity were observed concurrently in the comet assay at the same concentrations (de Oliveira et al., 2009). In addition, other studies described the same profile for compounds derived from natural products (Miyaji et al., 2004). Specifically, with regard to derivatives of *C. sylvestris*, the possible acetylation of DNA that generates a genotoxic response may also be responsible for the acetylation of histones. It is already known that histone acetylation results in DNA relaxation; thus, the DNA becomes accessible to the transcriptional machinery (Sterner and Berger, 2000), thereby enabling the correction of lesions, either by the DNA repair mechanism or by the transcription of detoxificant enzymes (Li et al., 2007). Concerning the detoxificant activity, the results of post-treatment with CASB in the comet assay (Fig. 4) can be explained by the antioxidant DCFDA assay results, which show that CASB significantly induced antioxidant enzymes that reduce ROS generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 5). This finding explains why both a desmutagenic and a bioantimutagenic response were observed in this work, and why de Oliveira et al. (2009) observed protection to damage induced by cyclophosphamide in an animal model.

Complementarily, to the comet assay the use of 24 h treatment was performed to allow the cell to complete one entire cell cycle, consequently, it was possible to express DNA repair machinery (post-treatment) or induce antioxidant enzymes (pre-treatment). Because of this, there was a difference in the percent DNA damage in the comet tail observed in both pre- and post-treatments that was clearly observed in the vehicle controls. The explanation for this result is that the pre-treatment consists of treating cells with vehicle control or compound, then inducing genotoxic damage followed by the comet assay. Damage occurs, but the repair system of the cell does not have enough time to repair it; therefore, higher values of damage are observed. However, with the post-treatment, damage is generated and then the treatments are added for 24 h, thus allowing the time required for the cell to repair any damage spontaneously, resulting in the vehicle control showing less damage after the post-treatment compared to pre-treatment. However, there is significant residual damage (shown in vehicle control) that the cell cannot repair itself, and the possible reduction of this damage is evaluated with the post-treatment of cells with the compounds.

Additionally, compared to other compounds that are antimutagenic and antioxidant, such as *N*-acetyl-L-cysteine (MID<sub>50</sub> = 0.07 mg/plate; TA 100; against 4-nitroquinoline 1-oxide) or myrcetin, a flavonoid extracted from natural products (MID<sub>50</sub> = 0.16 mg/plate; TA 98; S9 incubation, against cigarette smoke condensate) (Camoirano et al., 1994), CASB was most efficient on protecting

DNA from damage once it presented a MID<sub>50</sub> lower than *N*-acetyl-L-cysteine or myrcetin as shown in Table 2: (MID<sub>50</sub> = 0.04 mg/plate; TA 102; against MMC); (MID<sub>50</sub> = 0.003 mg/plate; TA 98; S9 incubation; against AFB).

In the Ames test, CASB strongly inhibited the effects of AFB in the TA 98 strain under metabolization in the antimutagenesis assay. These results indicate that CASB interacts with AFB and may inhibit the microsomal activation of AFB to electrophilic metabolites (Ammar et al., 2008). In the TA 102 strain, a lower inhibition of the direct agent MMC was observed when compared to AFB. This result demonstrates that CASB is highly efficient in protecting DNA from damage under a metabolization model.

In conclusion, CASB showed interesting chemopreventive characteristics in both HepG2 cells and *S. typhimurium* strain by protecting DNA against different types of damage and by acting as an antioxidant through inducing detoxificant enzymes in HepG2 cells.

#### Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Uncited reference

Kanokmedhakul et al. (2007).

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP, São Paulo Research Foundation; Grant no. 2008/58908-0 to A.M.P and 2009/52481-7 to C.P.S), from the Biota-FAPESP Program (Grant no. 2003/02176-7 to V.S.B.), from the BIOprospecTA Program (Grant no. 2004/07932-7 to D.H.S.S. and A.J.C.), and from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, National Council for Scientific and Technological Development; Grant no. 305615/2006-8 to C.P.S.; scholarship grant to A.G.S.). We wish to thank Silvia Helena de Oliveira David for her excellent technical assistance.

#### References

- Ammar, R.B., Sghaier, M.B., Boubaker, J., Bhouiri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhleb, I., Kilani, S., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2008. Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub>-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chem. Biol. Interact.* 174, 1–10.
- Basile, A.C., Sertie, J.A., Panizza, S., Oshiro, T.T., Azzolini, C.A., 1990. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *J. Ethnopharmacol.* 30, 185–197.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* 97, 267–281.
- Borges, M.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Andriao-Escarso, S.H., Diniz, H., Hamaguchi, A., Quintero, A., Lizano, S., Gutierrez, J.M., Giglio, J.R., Homs-Brandeburgo, M.I., 2000. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 127, 21–30.
- Brestel, E.P., 1985. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126, 482–488.
- Busch, S.J., Barnhart, R.L., Martin, G.A., Flanagan, M.A., Jackson, R.L., 1990. Differential regulation of hepatic triglyceride lipase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene expression in a human hepatoma cell line, HepG2. *J. Biol. Chem.* 265, 22474–22479.
- Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A., Vanden Berghe, D., 1996. Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Med.* 62, 222–226.
- Camoirano, A., Balansky, R.M., Bennicelli, C., Izzotti, A., D'Agostini, F., 1994. Experimental databases on inhibition of the bacterial mutagenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide and cigarette smoke. *Mutat. Res.* 317, 89–109.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143–151.

- Cuthbert, C., Wang, Z., Zhang, X., Tam, S.P., 1997. Regulation of human apolipoprotein A-I gene expression by gramoxone. *J. Biol. Chem.* 272, 14954–14960.
- de Carvalho, P.R., Furlan, M., Young, M.C., Kingston, D.G., Bolzani, V.S., 1998. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Phytochemistry* 49, 1659–1662.
- de Oliveira, A.M., dos Santos, A.G., Dos Santos, R.A., Csipak, A.R., Olivato, C., da Silva, I.C., de Freitas, M.B., Bassi, C.L., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V.S., Silva, D.H., Sakamoto-Hojo, E.T., Takahashi, C.S., Soares, C.P., 2009. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. *Mutagenesis* 24, 501–506.
- Dellai, A., Mansour, H.B., Limem, I., Bouhrel, I., Sghaier, M.B., Boubaker, J., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2009. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the flowers of *Phlomis crinita* Cav. ssp. *mauritanica* munby from the center of Tunisia. *Drug Chem. Toxicol.* 32, 283–292.
- dos Santos, A.G., Ferreira, P.M., Vieira Junior, G.M., Perez, C.C., Gomes Tininis, A., Silva, G.H., Bolzani Vda, S., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa Cdo, O., Cavalheiro, A.J., 2010. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chem. Biodivers.* 7, 205–215.
- Esteves, I., Souza, I.R., Rodrigues, M., Cardoso, L.G., Santos, L.S., Sertie, J.A., Perazzo, F.F., Lima, L.M., Schneedorf, J.M., Bastos, J.K., Carvalho, J.C., 2005. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J. Ethnopharmacol.* 101, 191–196.
- Gupta, D.K., Nicoloso, F.T., Schetinger, M.R., Rossato, L.V., Pereira, L.B., Castro, G.Y., Srivastava, S., Tripathi, R.D., 2009. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown Zea mays seedlings under moderate lead stress. *J. Hazard. Mater.* 172, 479–484.
- Hosseinimehr, S.J., Karami, M., 2005. Citrus extract modulates genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 505–509.
- Kada, T., Shimoi, K., 1987. Desmutagens and bio-antimutagens – their modes of action. *BioEssays* 7, 113–116.
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Buayairaksa, M., 2007. Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiifolia*. *J. Nat. Prod.* 70, 1122–1126.
- Knasmüller, S., Cavin, C., Chakraborty, A., Darroudi, F., Majer, B.J., Huber, W.W., Ehrlich, V.A., 2004a. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human-derived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. *Nutr. Cancer* 50, 190–197.
- Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J., Majer, B.J., 2004b. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology* 198, 315–328.
- Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A., Ames, B.N., 1982. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A × T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7445–7449.
- Li, B., Carey, M., Workman, J.L., 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707–719.
- Maistro, E.L., Carvalho, J.C., Mantovani, M.S., 2004. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. *Toxicol. In Vitro* 18, 337–342.
- Majer, B.J., Mersch-Sundermann, V., Darroudi, F., Laky, B., de Wit, K., Knasmüller, S., 2004. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. *Mutat. Res.* 551, 153–166.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173–215.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H., 2009. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern. Med.* 9, 4.
- Oberlies, N.H., Burgess, J.P., Navarro, H.A., Pinos, R.E., Fairchild, C.R., Peterson, R.W., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Wani, M.C., Wall, M.E., 2002. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J. Nat. Prod.* 65, 95–99.
- Sertié, J.A., Carvalho, J.C., Panizza, S., 2000. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharm. Biol.* 38, 112–119.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Sterner, D.E., Berger, S.L., 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 435–459.
- Tachino, N., Guo, D., Dashwood, W.M., Yamane, S., Larsen, R., Dashwood, R., 1994. Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. *Mutat. Res.* 308, 191–203.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.
- Varella, S.D., Pozetti, G.L., Vilegas, W., Varanda, E.A., 2004. Mutagenic activity of sweepings and pigments from a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. *Food Chem. Toxicol.* 42, 2029–2035.
- Vargas, V.M., Motta, V.E., Henriques, J.A., 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.* 319, 31–45.
- Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A., 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.* 31, 1035–1042.
- Zeiger, E., 2007. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? *Mutat. Res.* 626, 1–3.