

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

Marques, Eduardo de Souza.

Investigação do potencial genotóxico do extrato de *Garcinia achachairu in vivo* / Eduardo de Souza Marques. – Botucatu : [s.n.], 2012

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

Orientador: Edson Luis Maistro

Capes: 20206003

1. Mutagênese. 2. Mamífero. 3. Plantas medicinais. 4. Célula.

Palavras-chave: Camundongo; Ensaio cometa; Extrato de *Garcinia achachairu*; Genotoxicidade; Mutagenicidade; Teste do Micronúcleo.

Dedico esse trabalho...

...Aos meus amados pais: Divina e Marcos por muitas vezes abdicarem de seus sonhos e planos para realizarem os meus. Obrigado pelo amor, apoio e incentivo que foram imprescindíveis em toda minha vida.

... Aos meus queridos irmãos: Gabriela e Felipe. Ao meu sobrinho Kevin e minha namorada Denise. Obrigado pela aposta e estímulo em meu sucesso.

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Edson Luis Maistro, pela confiança, orientação, paciência e sinceridade incondicional. Obrigado por transmitir e compartilhar seus conhecimentos, experiências profissionais e de vida. Agradeço ainda por ter aberto as portas do laboratório para a realização desse trabalho e que venha o Doutorado!

Aos professores Dr. César Martins, Dr. Wellerson Rodrigo Scarano e Reinaldo José da Silva por participarem de minha banca de qualificação e contribuições. Levá-las-ei eternamente em minha vida profissional e acadêmica. Obrigado também pelas disciplinas ministradas.

Agradeço ainda o aceite de membro da banca de defesa do mestrado: Professores Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez (UEL) e Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Às colegas Ivani Aquino e Patrícia Martins que me receberam muito bem ao laboratório, bem como no treinamento sobre mutagênese e assistência durante todo o mestrado.

Botucatu ficou pequena com a presença do Trio (Risos)! Agradeço imensamente aos amigos Rafael Fedato e Álvaro Martins, obrigado pela companhia nas viagens, congressos, disciplinas, experimentos, churrascos, enfim, em todos os momentos. Fico feliz em ter pessoas como vocês das quais posso contar praticamente para tudo.

Ao Wilson (xis), Gabriel e Erick pela hospedagem, confiança e companhia em Botucatu. Muito Obrigado.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada da UNESP/Botucatu, pela oportunidade oferecida e apoio, especialmente ao Davi, “Lus” e Herivaldo.

À Marcela Tsuboy, obrigado pelos conselhos e ajuda. Conto com você (Risos)!

E por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus Sinceros Agradecimentos.

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”

Albert Einstein

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos.....	16
Figura 2. Imagens do ensaio cometa mostrando diferentes níveis de danos no DNA.....	20
Figura 3. Eritrócito policromático (PCE) micronucleado, sem micronúcleo e eritrócito normocromático (NCE) sem micronúcleo.....	25
Figura 4. Formação de célula micronucleada por clastôgenese, contendo fragmento cromatídico acêntrico.....	26
Figura 5. Formação de célula micronucleada por aneugênese, contendo cromossomo inteiro.....	26
Figura 6. Fotografia das diferentes partes da <i>Garcinia achachairu</i>	28
Figura 7. Estrutura química da gutiferona A isolada das sementes de <i>G. achachairu</i>	30

ARTIGO

Graphical abstract.....	46
Figure 1. Effect of <i>Garcinia achachairu</i> extract (GAE) in different cells of mice by comet assay.....	60
Table 1. Number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) observed in the bone marrow cells of male (M) Swiss mice treated with <i>Garcinia achachairu</i> extract (GAE), and respective controls.....	61

ANEXOS

Table 1 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of <i>Garcinia achachairu</i> extract in peripheral blood cells (collected 4 h after treatment) from male Swiss mice (M) <i>in vivo</i>	65
---	----

Table 2 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Garcinia achachairu* extract in peripheral blood cells (collected 24 h after treatment) from male Swiss mice (M) *in vivo*.....**66**

Table 3 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Garcinia achachairu* extract in liver cells (collected 24 h after treatment) from male Swiss mice (M) *in vivo*...**67**

Table 4 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Garcinia achachairu* extract in bone marrow cells (collected 24 h after treatment) from male Swiss mice (M) *in vivo*.....**68**

Table 5 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Garcinia achachairu* extract in testicles cells (collected 24 h after treatment) from male Swiss mice (M) *in vivo*.....**69**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius

µg/mL – Micrograma por mililitro

A2780 – *Human ovarian cancer cell line* (Câncer de ovário humano)

AC – teste de aberração cromossômica

ANOVA – Analysis of variance (Análise de variância)

CEP – Comitê de ética e pesquisa

cm – Centímetro

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

Da – Dalton

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucléico)

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DXR – Doxorubicin (Doxorrubicina)

FAMEMA – Faculdade de Medicina de Marília

FISH – Hibridação *in situ* por Fluorescência

g – Grama

GAE – *Garcinia achachairu extract* (extrato de *Garcinia achachairu*)

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

Hep 3B – *Human hepatoma cell line* (Hepatoma celular humano)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

HT 29 – *Human colon adenocarcinoma cell line* (Adenocarcinoma colo retal humano)

iNOS – Óxido Nítrico isoforma Induzível

KB – *Human carcinoma of the nasopharynx cell line* (Carcinoma de nasofaringe humano)

Kg – Kilograma

KS – *Kruskal–Wallis*

LMP – *Low Melting Point Agarose* (Agarose de baixo ponto de fusão)

M – Molar

mA – Miliampère

MCF-7 – *Human breast adenocarcinoma cell line* (Adenocarcinoma de mama humano)

mm – Milímetro

mM – Milimolar

MN – Micronúcleo

MNPCE – Eritrócito Policromático Micronucleado

NCE – Eritrócito Normocromático

nm – Nanômetro

NMP – *Normal Melting Point Agarose* (Agarose de ponto de fusão normal)

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCE – Eritrócito Policromático

pH – Potencial hidrogeniônico

SCE – Teste de troca de Cromátides Irmãs

SCGE – *Single Cell Gel Eletrophoresis*

SK-MEL-28 – *Human melanoma* (**Melanoma humano**)

SW-480 – *Human colon adenocarcinoma cell line* (Adenocarcinoma colo retal humano)

V – Volt

Resumo

Garcinia achachairu Rubsy (Clusiaceae) é popularmente conhecida como "achachairú", e é usada na medicina popular boliviana como cicatrizante, digestiva, propriedades laxativa e no tratamento de gastrite, reumatismo e inflamações. Apesar de sua ampla utilização terapêutica, há uma carência de dados acerca de seus efeitos genotóxicos *in vivo*. Contudo, neste trabalho, foi utilizado o ensaio cometa e teste do micronúcleo, respectivamente, para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e clastogênicos do extrato de semente de *Garcinia achachairu* (GAE) em diferentes células de camundongos. O extrato foi administrado via gavagem em doses de 500, 1000 e 2000 mg / kg. Para as análises, foram realizados o ensaio cometa em leucócitos (coletados 4 e 24 horas após o tratamento), fígado, medula óssea e células testiculares (coletadas 24 horas após o tratamento), e o teste de micronúcleo (MN) em células da medula óssea. A citotoxicidade foi avaliada pela contagem consecutiva de 200 eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) (PCE / NCE relação). Os resultados mostraram que o GAE não induziu danos ao DNA significativos em leucócitos (amostras de 4h e 24h), fígado, medula óssea e células testiculares (amostras de 24h amostras). Não foi evidenciado aumento significativo de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) nas três doses testadas. A relação PCE / NCE não indicou citotoxicidade. Nas nossas condições experimentais, os dados obtidos sugerem que uma única administração oral do extrato de *G. achachairu* não causa genotoxicidade e clastogenicidade em diferentes células de camundongos.

Abstract

Garcinia achachairu Rubsy (Clusiaceae) is popularly known as "achachairu", and is used in folk Bolivian medicine for its healing, digestive, and laxative properties, and in the treatment of gastritis, rheumatism and inflammation. Despite its widespread therapeutic use, there is a lack of data regarding its *in vivo* genotoxic effects. Therefore, in this study, we used the comet assay and the micronucleus test, respectively, to evaluate the possible genotoxic and clastogenic effects of *Garcinia achachairu* seed extract (GAE) on different cells of mice. The GAE was administered by oral gavage at doses of 500, 1000 and 2000 mg/kg. For the analysis, the comet assay was performed on the leukocytes (collected 4 and 24 hours after treatment), liver, bone marrow and testicular cells (collected 24 hours after treatment), and the micronucleus test (MN) on bone marrow cells. Cytotoxicity was assessed by scoring 200 consecutive polychromatic (PCE) and normochromatic (NCE) erythrocytes (PCE/NCE ratio). The results showed that GAE did not induce significant DNA damage in leukocytes (4h and 24 h samples), liver, bone marrow and testicular cells (24 h samples). Neither did they show any significant increase in micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) at the three tested doses. The PCE/NCE ratio indicated no cytotoxicity. Under our experimental conditions, the data obtained suggest that a single oral administration of *G. achachairu* extract does not cause genotoxicity and clastogenicity in different cells of mice.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Mutagênese.....	15
1.2 Ensaio Cometa.....	19
1.3 Teste do Micronúcleo.....	23
1.4 <i>Garcinia achachairu</i>	28
2. OBJETIVO.....	32
2.1 Objetivos específicos.....	32
3. REFERÊNCIAS.....	33
4. ARTIGO – Genotoxicity assessment of <i>Garcinia achachairu</i> Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells <i>in vivo</i>”.....	43
ANEXOS.....	62

INTRODUÇÃO

1.1 Mutagênese

Os organismos vivos estão frequentemente expostos a agentes ambientais que podem induzir modificações químicas no DNA, a molécula responsável pela informação genética das células, promovendo o aparecimento de mutações, as quais ocorrem em todos os seres vivos e exerce papel fundamental na evolução e diversidade das espécies. Sem mutação, não há variabilidade genética e assim não há evolução (IARMARCOVAI et al., 2007; AMES e GOLD, 2000).

Sabe-se ainda que essas lesões no DNA podem ser induzidas por agentes químicos exógenos (Figura 1), provenientes do meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural; ou resultantes de reações químicas – causas endógenas - que ocorrem nas próprias células e, na maioria das vezes são pré-determinadas geneticamente, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender de agressões externas, conferindo ao organismo proteção. Contudo, ambos os fatores estão inter-relacionados a carcinogênese, sendo que 80% a 90% dos casos de câncer estão associados a fatores ambientais. (GUYTON et al., 2009; AMES e GOLD, 2000).

Por causarem lesões no material genético e potencialmente gerarem tumores em seres humanos, esses agentes são normalmente conhecidos como mutagênicos ou carcinogênicos. Atualmente, a presença de produtos químicos carcinogênicos no meio ambiente vem sofrendo um crescente aumento, devido à atividade humana, tanto rural e industrial, quanto urbana. A detecção de substâncias derivadas dessas atividades e seus prováveis efeitos nos organismos são importantes no estudo do impacto que possam acometer as populações animal, vegetal e humana (RABELLO-GAY et al., 1991).

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

Figura 1. Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos. Fonte: Ribeiro et al. (2003).

Essas alterações ocorridas no material genético, quando não reparadas, podem levar a mutações, e sabe-se que a capacidade de reparo do DNA diminui com o passar do tempo e que a taxa de mutação de cada divisão celular aumenta com a idade do indivíduo (IARMARCOVAI et al., 2007).

Como resultado dessa interação de compostos genotóxicos com o DNA, caso não ocorra o reparo propriamente dito, a lesão no DNA pode ser propagada para as células filhas. A célula, por sua vez, pode permanecer latente por muitos anos acumulando novos danos ou ainda sofrer uma exposição posterior a um agente promotor. Em ambos os casos, poderia desencadear um processo de malignização, cujos agentes iniciadores geralmente estabelecem

ligações diretas ao DNA, enquanto que os promotores podem agir mimetizando hormônios, alterando a expressão gênica ou vias metabólicas das células (PAGES e FUCHS, 2002; RADMAN et al., 1995).

Os agentes mutagênicos atuam de maneira direta ou indireta. O primeiro não exige sistema de metabolização porque por si só causa dano genético (ex: bleomicina e metilmetanosulfonato). O segundo requer metabolização para que seus metabólitos danifiquem o DNA (ex: ciclofosfamida e benzo[a]pireno) (BRUSICK, 1988).

Algumas dessas substâncias, por exemplo, já são conhecidas e estão presentes em nossa dieta alimentar, quando durante o cozimento de alguns alimentos como carnes brancas e vermelhas ocorre à formação de amins heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os quais são considerados agentes mutagênicos (IARMARCOVAI et al., 2007; FERGUSON et al., 2004). Alguns desses mutágenos são chamados de aneugênicos, pois atuam provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante o processo de divisão celular, dando origem a aneuploidias. Outros, chamados de clastogênicos, induzem quebras e produzem alterações na estrutura do cromossomo. Estas quebras e alterações podem ser detectadas através de estudos citogenéticos. Portanto, tendo um efeito clastogênico ou não, através de ensaios de genotoxicidade e citogenéticos, é possível proceder-se à avaliação dos efeitos mutagênicos de um determinado composto, o que torna esses tipos de teste imprescindíveis nas avaliações de risco aos seres humanos e ao ambiente (RABELLO-GAY et al., 1991; TICE et al., 2000).

Não obstante, há substâncias que podem reduzir a frequência de alterações no DNA e têm sido importantes nas práticas terapêuticas devido à possibilidade da redução de mutações e, conseqüentemente, diminuição na incidência de câncer. (FERGUSON et al., 2004). Sendo assim, qualquer substância capaz de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou

induzidas, independentemente do mecanismo de ação, é considerada antimutagênica (DE FLORA, 1998).

Os compostos antimutagênicos vêm sendo analisados a partir de constituintes encontrados na natureza, como por exemplo, frutas e vegetais que são largamente encontradas na dieta e que podem ser isolados, podendo ser testados suas atividades e/ou efeitos antimutagênicos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (FRANCY-GUILFORD e PEZZUTO, 2008).

Dentre os estudos envolvendo a análise de antimutagenicidade, o potencial quimiopreventivo de uma substância é testado confrontando o suposto antimutagênico com uma substância sabidamente mutagênica e, então, deve-se analisar se a substância possui efeito quimio-protetor ou não em relação a sua ação sobre o material genético, como comprovado por Ribeiro e colaboradores (2010) cuja pesquisa demonstrou efeito protetor da polpa do açaí em células hepáticas e renais contra danos provocados pela doxorribucina – agente indutor de danos genéticos.

Dentre as ações benéficas dos diversos compostos que podem interagir com o organismo, é importante verificar que alguns de seus constituintes podem ser tóxicos ou ainda é possível a geração de metabólitos com esta mesma atividade. Segundo Ames (1983), elementos presentes em vegetais da dieta humana, além de outros tipos como medicinais, apresentam substâncias nocivas para o organismo. Plantas utilizadas por um grande número de pessoas podem possuir propriedades farmacológicas e, simultaneamente, também estar causando alterações no DNA (MARQUES et al., 2003).

De acordo com Rabello-Gay (1987), a genética toxicológica visa à identificação das substâncias capazes de induzir mutação e, também, a avaliação quantitativa do risco mutacional para o homem, para que se possam estabelecer níveis aceitáveis de exposição para que se tomem medidas preventivas para a redução de certos tipos de câncer, bem como a preservação do material genético.

Visando avaliar o espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos, se fez necessário a utilização de testes de toxicidade genética, os quais são de curta duração e avaliam a mutação gênica, o dano cromossômico ou lesão no DNA (BRUSICK, 1988), destacando-se o Ensaio cometa (SCGE) e o Teste do Micronúcleo, *in vivo*, utilizando normalmente células de mamíferos, geralmente camundongos, ou *in vitro*, onde pode-se utilizar uma gama de linhagens celulares, enfatizando as mais usadas e recomendadas: HepG2, HTC, V74, CHO entre outras (PFUHLER et al., 2011).

Valentin-Severin (2003) salientaram que a diferença entre os testes do cometa e do micronúcleo consiste basicamente no tipo de alteração detectada no DNA: o teste do cometa detecta lesões primárias, que muitas vezes são reparáveis, enquanto o teste do micronúcleo detecta lesões irreparáveis. O ensaio cometa e o teste do micronúcleo têm grande aceitação na comunidade científica; porém, aspectos envolvendo a escolha da metodologia, *in vivo* ou *in vitro*, devem ser avaliados. Contudo, Os testes de genotoxicidade/mutagenicidade são, portanto, de particular importância, pois são capazes de detectarem compostos que induzem danos genéticos direta (metabolização) ou indiretamente (biotransformação) por diversos mecanismos.

1.2 Ensaio Cometa

O ensaio cometa é uma das técnicas mais empregadas para avaliar a extensão do dano ao DNA, além de ser recomendado por órgãos nacionais e internacionais para avaliar produtos naturais ou sintéticos (OECD 420, 2001).

A técnica ainda é bastante utilizada em estudos nutricionais, especialmente na investigação do efeito protetor de componente da dieta frente a danos oxidativos e, por isso, é

considerado por alguns autores um biomarcador ideal para estudos de efeitos da nutrição sobre o câncer (DUTY et al., 2003; WASSON et al., 2008).

Uma das medidas utilizadas na avaliação da lesão é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão da “cauda” (Tail length) formada pelo DNA em migração (classificados como Classe 0 – nenhum dano, até Classe 4 – máximo dano) (SZETO et al., 2011).

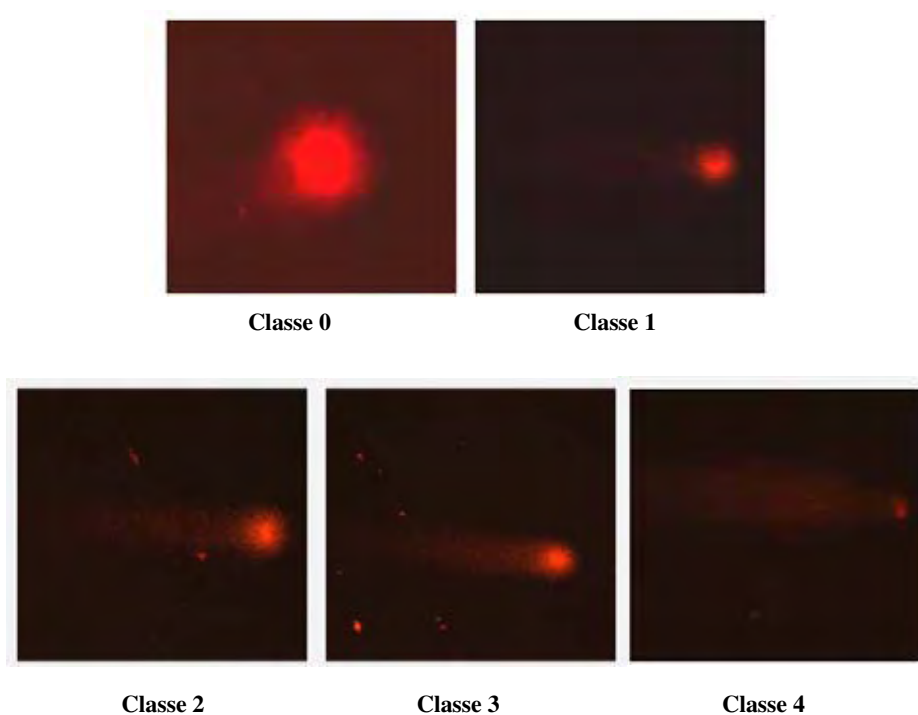


Figura 2. Imagens do ensaio cometa mostrando diferentes níveis de danos no DNA. Fonte: Szeto et al. (2011)

Outra forma de medir o dano é avaliar a distribuição do DNA na cauda. A partir destas medidas, outras foram sendo incorporadas na quantificação dos danos ao DNA. Alguns exemplos são: Cell area, Comet coefficient of variance, Comet distribution moment, Comet extent, Comet optical intensity, Head optical intensity, Tail mode, Tail mean, entre outras. Dessas análises, o comprimento da cauda em relação ao diâmetro do nucleóide pode ser medido visualmente. As outras necessitam de programas de análise, os quais são excelentes

ferramentas que podem quantificar os danos sofridos pelo DNA sob diferentes parâmetros. No entanto, o fator limitante para aquisição dos softwares é o alto custo. Para contornar estes inconvenientes existem programas de domínio público que permitem a análise das imagens de cometas (KUMARAVEL e JHA, 2006; KUMARAVEL et al., 2009).

Esse ensaio é de fácil execução, custo relativamente baixo, com boa reprodutibilidade, rapidez e sensibilidade. Permite ainda obter resultados a partir de poucas células e os dados são extraídos de cada célula individualmente, podendo ser usado para avaliar danos em células em experimentos *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo* (MONTEITH e VANSTONE, 1995; SASAKI et al., 1997; ROJAS et al., 1999; KUMARAVEL et al., 2009).

Ao contrário de outros tipos de ensaio como o dos micronúcleos (MN), de aberrações cromossômicas (AC) ou de trocas de cromátides irmãs (SCE) que necessitam de células em proliferação para sua viabilidade, o Ensaio Cometa não necessita desta condição podendo ser utilizado em qualquer tipo de célula (PANDRANGI et al., 1995; ROJAS et al., 1999).

Uma vez que substâncias genotóxicas muito frequentemente são tecido-específicas, ficam evidentes as vantagens do uso do Ensaio Cometa, já que, como citado, o ensaio não depende da proliferação celular e o tecido alvo do agente genotóxico pode ser analisado diretamente e quantificadas individualmente (PANDRANGI et al., 1995).

Rydberg e Johanson, citados por Rojas et al. (1999), foram os primeiros a quantificar o dano sofrido pelo DNA em células individualizadas.

Ostling e Johanson (1984) desenvolveram a eletroforese em lâmina com gel chamada então de Ensaio Cometa devido à forma característica tomada pelo DNA que sofreu o processo de migração ao final da aplicação do ensaio

Singh et al. (1988), com a intenção de verificar danos no DNA ocasionados por Raios – X e H₂O₂, desenvolveram uma variação da técnica anteriormente descrita, utilizando-se de um tampão de eletroforese com pH superior a 13. Com esta modificação é possível detectar

no DNA as quebras em fita simples, os sítios álcali – lábeis e sítios de reparo tardio. Esta é a versão conhecida por SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) e por motivos históricos com o nome de Ensaio Cometa.

Olive et al. (1990), modificaram alguns parâmetros da técnica de Ostling e Johanson (1984). Neste caso a lise das células é feita em meio alcalino e a eletroforese é executada em meio neutro ou alcalino (pH 12,3).

Embora as técnicas descritas por Olive et al. (1990) e Singh et al. (1988), sejam idênticas em princípio e similares na prática, o método desenvolvido por Singh parece ser pelo menos duas vezes mais sensível na capacidade de detectar danos (ROJAS et al., 1999).

Os locais do DNA que são suscetíveis ao processo de alquilação são mais sensíveis a degradação. Estes pontos, onde a depurinação está aumentada, transformam-se em pontos de quebras da fita de DNA sendo, portanto, visíveis através do Ensaio Cometa (HAHN e HOCK, 1999).

Collins et al. (1997, 2008) determinaram que o DNA não migra em fragmentos como na eletroforese convencional, onde a distância percorrida é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento. Destaca ainda que as distâncias entre as quebras originadas e detectadas pelo ensaio estão na ordem de 10⁹ Da, muito além da faixa detectável pela eletroforese convencional. Nesta, o comprimento dos fragmentos está na ordem de 1 mm enquanto que a cauda de um cometa mede um centésimo deste valor. É importante ressaltar que o ensaio detecta lesões genômicas que após processadas podem ou não resultar em mutações, isto é, o dano detectado pelo cometa é passível de reparo (PIPERAKIS, 2009).

Comparativamente com outros ensaios de genotoxicidade, o Ensaio Cometa parece ser mais sensível. Testes como SCE realizados no acompanhamento de ex-fumantes mostraram divergências nos resultados obtidos junto àqueles indivíduos que pararam de fumar a poucas semanas. Nesse estudo em particular, o Ensaio Cometa mostrou-se mais sensível do que o

SCE em revelar os efeitos do cigarro nestes grupos (BETTI et al., 1995). Para Frenzilli et al. (1997), que acompanharam um grupo de fumantes por um ano, o fator sensibilidade foi determinante na escolha do Ensaio Cometa para a realização do trabalho.

Chega-se a um consenso, todavia, que o ensaio cometa é uma valiosa ferramenta de investigação de danos no DNA e seus mecanismos de reparo, haja vista o seu amplo emprego na área clínica e em estudos de reparo do DNA; no biomonitoramento ambiental e no monitoramento humano (SRUT et al., 2011).

1.3 Teste do Micronúcleo

Ainda que a nossa compreensão a respeito da estrutura cromossômica seja incompleta, vários trabalhos têm apontado para a direção de que as anormalidades cromossômicas sejam uma consequência direta de danos causados na sua estrutura. Também é reconhecido que as perdas de cromossomos, ou parte deles; ou ainda as aneuploidias decorrentes de problemas de não disjunção, são fatores importantes em muitos tipos de câncer e no processo de envelhecimento. Estes problemas são ocasionados por defeitos no fuso, no centrômero ou ainda em função do grau de condensação dos cromossomos (FENECH, 2000).

Na citogenética clássica, a avaliação das alterações cromossômicas é realizada diretamente pela análise dos cromossomos, no entanto, a obtenção de metáfases é um processo trabalhoso e complexo. Com o intuito de verificar danos ao material genético foi estimulado o desenvolvimento de técnicas que permitissem esta avaliação de uma maneira mais rápida e eficiente (FENECH, 2000).

Schmid (1975) e Heddle (1973), independentemente, propuseram um tipo de ensaio que permitia a avaliação do dano ao DNA pela análise e quantificação de umas estruturas citoplasmáticas conhecidas pelos hematologistas como corpúsculos de Howell-Jolly, os quais

são encontrados em populações celulares em divisão. Estas estruturas receberam o nome de micronúcleos. Originalmente, o teste do micronúcleo foi desenvolvido para estudos *in vivo* dos efeitos de produtos químicos. Para este fim, eram utilizadas células eritrocitárias policromáticas obtidas da medula óssea do fêmur de camundongos. Mais tarde, passou-se a utilizar eritrócitos circulantes. Em qualquer caso, os testes são realizados normalmente com animais criados em laboratório e sob condições bem controladas (SCHMID, 1975).

O princípio do teste foi baseado no fato de que, durante a anáfase, as cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para pólos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero sim. Após a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas. Elementos que não foram transportados pelo fuso também podem ser englobados pelos núcleos recém formados. No entanto, alguns destes elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos novos núcleos e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleos (SCHMID, 1975).

Pode-se conceituar os micronúcleos como sendo corpúsculos extra nucleares formados durante o processo da mitose, os quais são o resultado de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não ficaram incluídos em nenhum dos núcleos filhos, originados no processo de divisão celular (ALBERTINI et al., 2000).

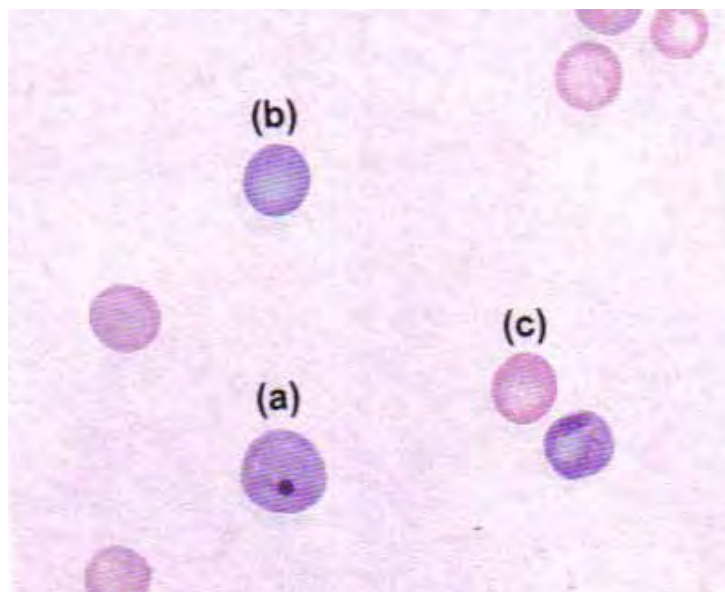


Figura 3. Eritrócito policromático (PCE) micronucleado (a), sem micronúcleo (b) e eritrócito normocromático (NCE) sem micronúcleo (c). Fonte: Ribeiro et al. (2003).

Segundo Ferrari (1991), “os micronúcleos se originam a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos que não foram incorporados ao núcleo de célula-filha durante a divisão celular. Assim, o ensaio detecta tanto os eventos clastogênicos como defeitos no fuso da célula”.

Desta maneira, os efeitos de substâncias que provoquem quebras cromossômicas ou ainda afetem os componentes do fuso ou da região centromérica podem ser detectados a partir da presença de micronúcleos. Deve-se ressaltar que nem todos os produtos genotóxicos são clastogênicos, muitos induzem a formação dos micronúcleos por sua capacidade de afetarem o fuso (HEDDLE et al., 1991).

Posto isto, eventos clastogênicos ou aneugênicos dariam origem aos micronúcleos. Os primeiros referem-se aos eventos de dano diretamente no cromossomo e seus componentes, notadamente no DNA. O segundo refere-se aos eventos que causam danos no mecanismo do fuso e outros componentes envolvidos na separação dos cromossomos (ALBERTINI et al., 2000).

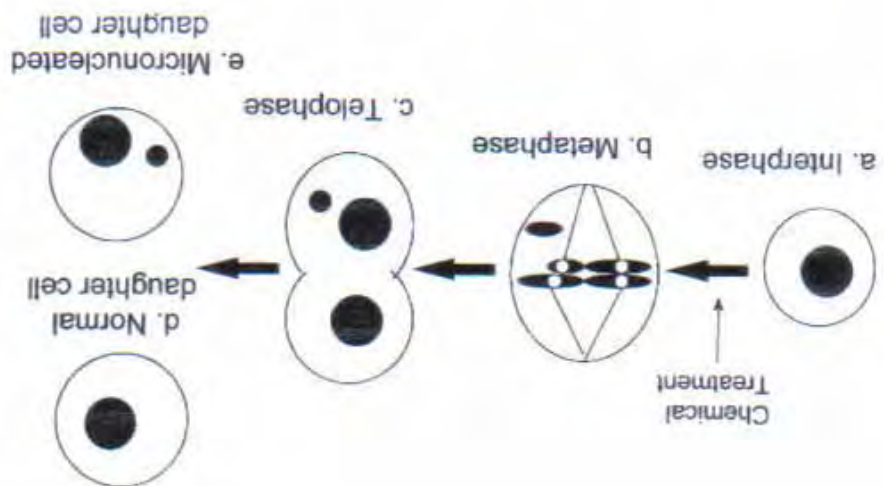


Figura 4. Formação de célula micronucleada por clastogênese, contendo fragmento cromatídico acêntrico. Fonte: (AARDEMA e KIRSCH-VOLDERS, 2001).

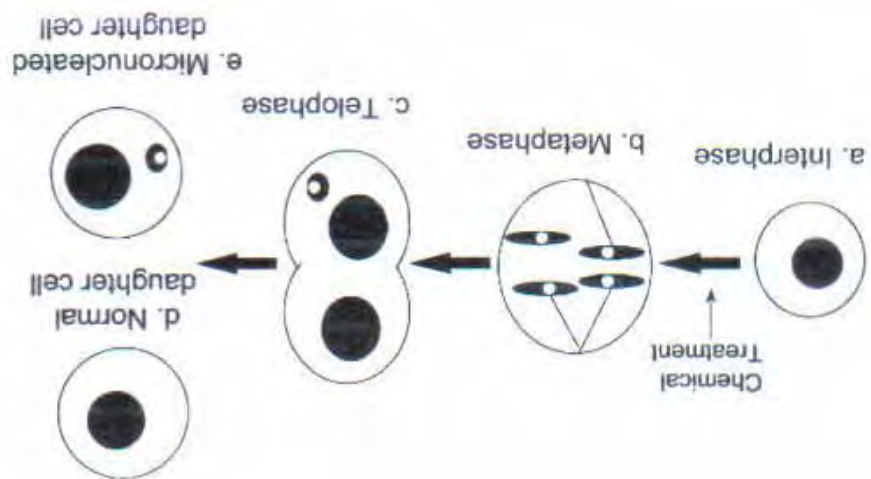


Figura 5. Formação de célula micronucleada por aneugênese, contendo cromossomo inteiro. Fonte: (AARDEMA e KIRSCH-VOLDERS, 2001).

Para Heddle et al. (1983), este teste é potencialmente sensível para quantificar a frequência de anormalidades cromossômicas surgidas nos cromossomos humanos.

A distinção do micronúcleo contendo cromossomos inteiros de um contendo fragmentos cromossômicos acêntricos pode ser realizada através de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), com sondas de regiões pericentrométricas (MATEUCA et al., 2006).

Em todos os ensaios com micronúcleos deve-se levar em consideração a ocorrência espontânea destes, embora o número basal seja baixo, pode aparecer em maior frequência em roedores (WILLIAMS e METCALFE, 1992).

Como em qualquer técnica laboratorial, alguns fatores devem ser considerados na aplicação do ensaio com micronúcleos. Este ensaio não é capaz de detectar as não-disjunções mitóticas se estas não levarem à perda de cromossomos na anáfase, bem como não será possível detectar aberrações cromossômicas causadas por rearranjos, tais como translocações ou inversões, se estas não originarem fragmentos acêntricos. Dessa forma, o teste, nesses casos, apresenta uma subestimada e falta de sensibilidade (METCALFE, 1989).

O ensaio do micronúcleo *in vitro* com bloqueio de citocinese (MNCTB), desenvolvido por Fenech e Morley em 1985, tornou-se um dos testes citogenéticos padrão para análise da frequência de micronúcleos em células humanas (FENECH, 2006) e agências reguladoras já o incorporam na bateria de teste recomendados para o acesso ao potencial mutagênico de novo agente (OECD 420, 2001). Além da análise do micronúcleo, outros parâmetros podem ser investigados na mesma cultura e na mesma lâmina. A viabilidade celular pode ser mensurada através da análise das células necróticas e apoptóticas; a condição mitótica através da contagem das células mono, bi e multinucleada e posterior cálculo do índice de divisão nuclear; e, finalmente, a instabilidade cromossômica ou extensão do dano, através da análise da presença de micronúcleo e ponte nucleoplasmática (FENECH, 2006).

Os ensaios feitos a partir da medula óssea de roedores são amplamente utilizados em estudos de genotoxicidade e fazem parte dos estudos sobre a avaliação de segurança de vários produtos (KRISHNA et al., 2000).

1.4 *Garcinia achachairu*

Denominado anteriormente de *Rheedia*, o gênero *Garcinia* pertence à família Clusiaceae a qual possui aproximadamente 1350 espécies. Plantas deste gênero são comumente encontradas na região tropical da Ásia tropical, África, Nova Caledônia, Polinésia e Brasil (ALMEIDA et al., 2008; MASULLO et al., 2008; WILLIAMS et al., 2003).

Garcinia achachairu Rusby conhecida como “achacahairú” é oriunda da região de Santa Cruz - Bolívia e muito bem adaptada no clima brasileiro. Na medicina popular, os frutos e folhas são utilizados como cicatrizantes, digestivos e laxantes e em tratamentos de reumatismo, úlcera gástrica e inflamação. No Brasil, o achachairú é pouco conhecido e, às vezes, confundido pelo público leigo como frutas de outras espécies, como o bacupari, bacuripari e bacurizinho. Embora seus frutos sejam comercializados na Bolívia e em grande parte do nordeste brasileiro, raros são os estudos científicos sobre esta espécie (BARBOSA; ARTIOLE, 2007; MOLIN, 2009).

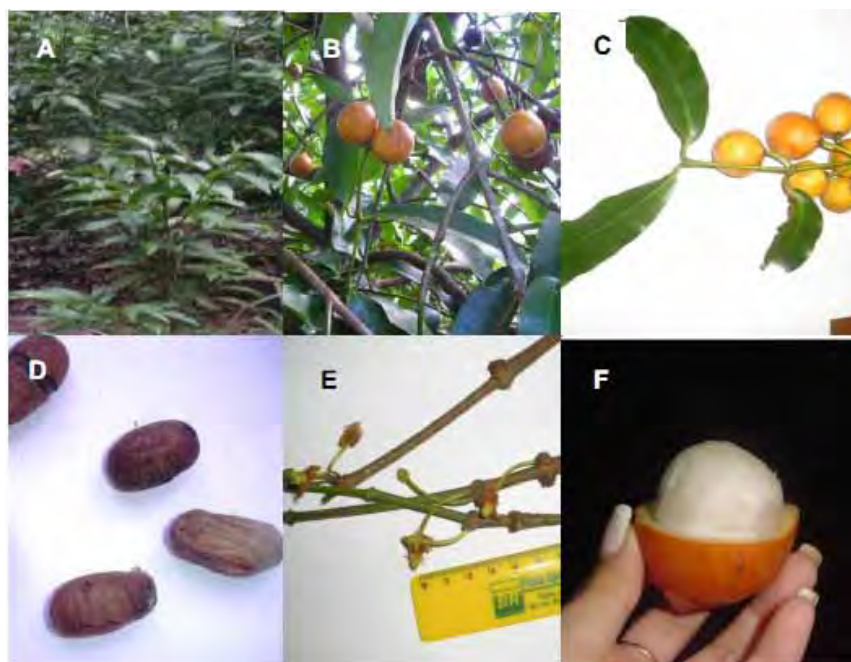


Figura 6. Fotografia das diferentes partes da *Garcinia achachairu* - A = partes aéreas; B e C = folhas e frutos; D = sementes; E = flores; F = fruto. Fonte: Molin, 2009.

O gênero *Garcinia* ainda tem demonstrado, por intermédio de estudos químicos, ser possuidor de uma grande diversidade de classes estruturais, como benzofenonas

poliisopreniladas, flavonóides, cumarinas e xantonas, exibindo, no entanto, detentora de uma fonte rica de moléculas com um amplo perfil farmacológico (CARROL et al., 2009; MASULLO et al., 2008; DEACHATHAI et al., 2006; PANTHONG et al., 2006; TAHER et al., 2005; WILLIAMS et al., 2003).

O amplo espectro das atividades biológicas destes compostos incluem os efeitos de inibição citopática, sendo pela infecção do HIV *in vitro*; de radicais livres; iNOS e COX-2, inibindo a expressão em carcinoma de cólon; pela indução de apoptose e antiúlcera, atividade antioxidante e propriedade tripanocida (MARTINS et al., 2007).

Dentre alguns estudos realizados com essas espécies, pode-se destacar os estudos:

Garcinia virgata, das quais foram isoladas duas novas gutiferonas, denominadas gutiferona I e J, além de outros compostos já conhecidos, tais como gutiferona E e xantoximol. Essas benzofenonas apresentaram atividade citotóxica em células da linhagem KB (MERZA et al., 2006).

Do extrato etanólico da *Garcinia calcicola*, foram identificadas duas novas gutiferonas: K e L. Ambas apresentaram atividades antiproliferativa em células A2780 (CAO et al., 2007).

Já do extrato metanólico dos frutos de *Garcinia xanthochymus*, foram extraídas duas novas benzofenonas denominadas de gutiferona H e gambogenona. Esses compostos induziram apoptose em células cancerígenas SW-480 e também apresentaram atividade antioxidante, utilizando o teste DPPH (BAGGETT et al., 2005).

Da planta *Garcinia mangostana* conhecida popularmente como mangostão foram isolados os compostos de xantonas (α -mangostin, γ -mangostin, e 8-deoxygartanin) e testados o efeito citotóxico usando a linhagem celular SK-MEL-28. Os resultados dos três compostos de xantonas naturais testados, especialmente α -mangostin, são de grande potencialidade para serem agentes anti-câncer de pele e afirmam que o estudo da linhagem de células de melanoma forneceu uma base sólida para uma investigação mais aprofundada sobre os mecanismos moleculares dos três compostos de xantonas e sua eficácia terapêutica *in vivo* (WANG et al., 2011).

O composto da mesma planta - α -mangostin – em outro estudo, induziu um aumento significativo na sobrevivência e supressão de crescimento tumoral e metástase linfonodal em um modelo de câncer mamário de ratas portadoras de mutação p53. Tendo em conta que o envolvimento linfonodal é o fator de prognóstico mais importante em pacientes com câncer de mama, a atividade de “ α -antimetastatic mangostin”, em particular, pode ser um achado crucial

com aplicação clínica futura. Além disso, α -mangostin pode ser útil como terapia adjuvante ou medicina alternativa complementar e, possivelmente, como uma ferramenta para a quimioprevenção do desenvolvimento de câncer de mama (SHIBATA et al., 2011).

Da espécie *Garcinia subelliptica*, foi isolado dois novos compostos, uma benzofenona denominada garcinialliptona FA e uma benzoilfluoroglucinol denominada garcinialliptona FB. Os compostos mostraram atividade citotóxica contra as linhagens Hep 3B, MCF-7 e HT 29 (WU et al., 2005).

Na análise fitoquímica do extrato das sementes de *Garcinia achachairu*, utilizadas neste trabalho, foi encontrada como composto majoritário, a gutiferona A (figura) (MOLIN, 2009).

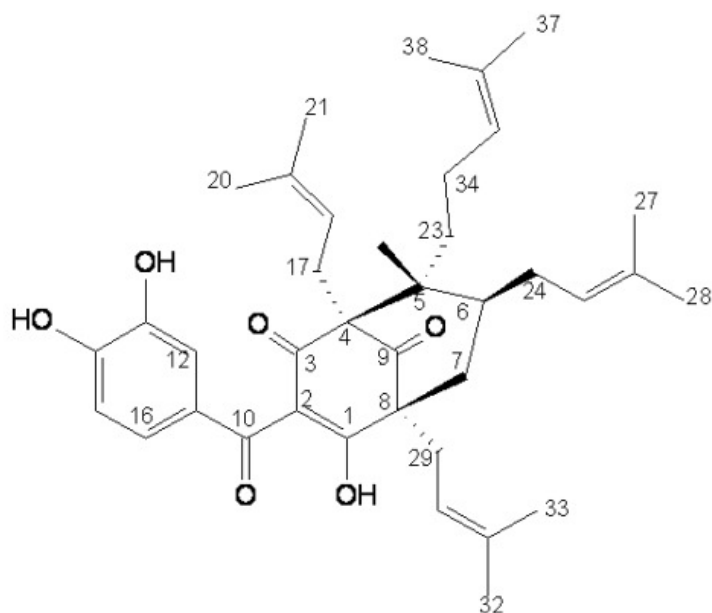


Figura 7. Estrutura química da gutiferona A isolada das sementes de *G. achachairu* (MOLIN, 2009).

A gutiferona A ainda é encontrada em outras espécies: *Rheedia edulis* (ACUÑA et al., 2010), *Garcinia intermédia* (ABE et al., 2004), *Garcinia brasiliensis* (MARTINS et al., 2009), *Symphonia pauciflora* (PANA et al., 2010) e *Symphonia globulifera* (NGOUELA et al., 2006; LENTA et al., 2007). Apresentando, contudo, como principais efeitos: antioxidante, atividade antitripanocida contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, antitumoral, atividade antiproliferativa em células A2780, atividade antiplasmodial e antioxidante respectivamente.

Até o momento, não há na literatura quaisquer testes genotoxicidade do extrato bruto
ou isolado de *Garcinia achachairu*.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo geral avaliar a capacidade de diferentes concentrações do extrato metanólico das sementes de *Garcinia achachairu* de induzir danos ao material genético em camundongos através da utilização do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo

2.1 Objetivos específicos

Avaliar a genotoxicidade do extrato metanólico das sementes de *Garcinia achachairu* em células de sangue periférico, fígado, medula óssea e testículos através do Ensaio Cometa.

Avaliar o potencial clastogênico do extrato metanólico das sementes de *Garcinia achachairu* em células da medula óssea de camundongos Suíços albinos através do Teste do Micronúcleo.

3. REFERÊNCIAS

AARDEMM, M. J., KIRSCH-VOLDERS, M. The in vitro micronucleus assay. In: CHOY, W.N (Ed). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1 ed. New York: Marcel Dekkerp. 163-186, 2001.

ABE, F., NAGAFUJI, S., OKABE, H., AKAHANE, H., ESTRADA-MUNIZ, E., HUERTA-REYES, M., REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 1, p. 141-3, Jan 2004.

ACUÑA, U. M., FIGUEROA, M., KAVALIER, A., JANCOVSKI, N., BASILE, M. J., KENNELLY, E. J. Benzophenones and biflavonoids from *Rheedia edulis*. **Journal of natural products**, v. 73, n. 11, p. 1775-9, Nov 29 2010.

ALBERTINI, R. J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G. R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A. T., NORPPA, H., SHUKER, D. E., TICE, R., WATERS, M. D., AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogen in human. **Mutation Research – Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALMEIDA, L. S., MURATA, R. M., YATSUDA, R., DOS SANTOS, M. H., NAGEM, T. J., ALENCAR, S. M., KOO, H., ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 15, n. 10, p. 886-91, Out 2008.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v. 221, n. 4617, p. 1256-64, Set 23 1983.

AMES, B. N., GOLD, L. S. Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. **Mutation research**, v. 447, n. 1, p. 3-13, Jan 2000.

BAGGETT, S., PROTIVA, P., MAZZOLA, E. P., YANG, H., RESSLER, E. T., BASILE, M. J., WEINSTEIN, I. B., KENNELLY, E. J. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. **Journal of natural products**, v. 68, n. 3, p. 354-60, Mar 2005.

BARBOSA, W.; ARTIOLE, F.A. **A fruta achachairú**. 2007. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/achachairu/index.htm. Acesso em: 17/11/2011.

BETTI, C., DAVINI, T., GIANNESI, L., LOPRIENO, N., BARALE, R. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. **Mutation Research**, v. 343, p. 201-207, 1995.

BRUSICK, D. Evolution of testing strategies for genetic toxicity. **Mutation research**, v. 205, n. 1-4, p. 69-78, Mai-Ago 1988.

CAO, S., BRODIE, P.J., MILLER, J.S., RATOVOSON, F., BIRKINSHAW, C., RANDRIANASOLO, S., RAKOTOBE, E., RASAMISON, V. E., KINGSTON, D. G. Guttiferones K and L, antiproliferative compounds of *Rheedia calcicola* from the Madagascar rain forest. **Journal of natural products**, v. 70, n. 4, p. 686-8, Abr 2007.

CARROLL, A. R., SURAWEEERA, L., KING, G., RALI, T., QUINN, R. J. Guttiferones O and P, prenylated benzophenone MAPKAPK-2 inhibitors from *Garcinia solomonensis*. **Journal of natural products**, v. 72, n. 9, p. 1699-701, Set 2009.

COLLINS, A. R., DOBSON, V. L., DUSINSKA, M., KENNEDY, G., STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 375, p. 183-193, 1997.

COLLINS, A. R., OSCOZ, A. A., BRUNBORG, G., GAIVAO, I., GIOVANNELLI, L., KRUSZEWSKI, M., SMITH, C. C., STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, 3, p. 143-151, 2008.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 402, p. 151-158, 1998.

DEACHATHAI, S., MAHABUSARAKAM, W., PHONGPAICHIT, S., TAYLOR, W. C., ZHANG, Y. J., YANG, C. R. Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 5, p. 464-9, Mar 2006.

DUTY, S. M., SINGH, N. P., SILVA, M. J., BARR, D. B., BROCK, J. W., RYAN, L., HERRICK, R. F., CHRISTIANI, D. C., HAUSER, R. The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. **Environmental health perspectives**, v. 111, n. 9, p. 1164-9, Jul 2003.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation research**, v. 600, n. 1-2, p. 58-66, 2006.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY, A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**, v. 43, n. 172-173, p. 233-46, 1985.

FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, v. 198, p. 147-159, 2004.

FERRARI, I. Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética. p. 107-122, 1991.

FRANCY-GUILFOR, J.; PEZZUTO, I. N. Mechanisms of cancer chemopreventive agents: A perspective. **Planta Médica**, v. 160, p. 171-177, 2006.

FRENZILLI, G., BETTI, C., DAVINI, T., DESIDERI, M., FORNAI, E., GIANNESI, L., MAGGIORELLI, F., PAOLETTI, P., BARALE, R. Evaluation of DNA damage in leukocytes

of ex-smokers by single gell electrophoresis. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 375, p. 117-123, 1997.

GUYTON, K. Z., KYLE, A. D., AUBRECHT, J., COGLIANO, V. J., EASTMOND, D. A., JACKSON, M., KESHAVA, N., SANDY, M. S., SONAWANE, B., ZHANG, L., WATERS, M. D., SMITH, M. T. Improving prediction of chemical carcinogenicity by considering multiple mechanisms and applying toxicogenomic approaches. **Mutation research**, v. 681, n. 2-3, p. 230-40, Mar-Jun 2009.

HAHN, A., HOCK, B. Assessment of DNA damage in filamentous fungi by single cell gel electrophoresis, comet assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 18, p. 1421–1424, 1999.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187–190, 1973.

HEDDLE, J. A., CIMINO, M. C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M. D., TUCKER, J. D., VANPARYS, P., MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of Citogenetic Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**. v. 18, p. 277–291, 1991.

HEDDLE, J. A., HITE, M., KIRKHART, B., MAVOURNIN, K., MACGREGOR, J. T., NEWELL, G. W., SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation research**, v. 123, n. 1, p. 61-118, Set 1983.

IARMARCOVAI, G., BOTTA, A., ORSIERE, T. [Micronuclei and genetic polymorphisms: from exposure to susceptibility]. **Annales de biologie clinique**, v. 65, n. 4, p. 357-63, Jul-Ago 2007.

KRISHNA, G.; URDA, G.; PAULISSEN, J. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of mutagenesis**, Amsterdam, v. 453, p. 45-50, 2000.

KUMARAVEL, T. S., JHA, A. N. Reliable Comet Assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals. **Mutation Research**, v. 544, p. 7-16, 2006.

KUMARAVEL, T. S., VILHAR, B., FAUX, S. P., JHA, A. N. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2009.

LENTA, B. N., VONTHRON-SENECHEAU, C., WENIGER, B., DEVKOTA, K. P., NGOUPAYO, J., KAISER, M., NAZ, Q., CHOUDHARY, M. I., TSAMO, E., SEWALD, N. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1548-57, 2007.

MARQUES, R. C., DE MEDEIROS, S. R., DIAS CDA, S., BARBOSA-FILHO, J. M., AGNEZ-LIMA, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation research**, v. 536, n. 1-2, p. 117-20, Abr 20 2003.

MARTINS, F. T., ASSIS, D. M., DOS SANTOS, M. H., CAMPS, I., VELOSO, M. P., JULIANO, M. A., ALVES, L. C., DORIGUETTO, A. C., Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 3, p. 1230-9, Mar 2009.

MARTINS, F. T.; CRUZ, JR. J. W., DEROGIS, P. M. C.; SANTOS, M. H.; VELOSO, M. P.; ELLENA, J.; DORIGUETO, A. C. Natural polyprenylated benzophenones: keto-enol tautomerism and stereochemistry. **J. Braz. Chem.**, v. 18, p. 1515-1523, 2007.

MASULLO, M., BASSARELLO, C., SUZUKI, H., PIZZA, C., PIACENTE, S. Polyisoprenylated benzophenones and an unusual polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the fruits of *Garcinia cambogia*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5205-10, Jul 9 2008

MATEUCA, R., LOMBAERT, N., AKA, P. V., DECORDER, I., KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515-31, Nov 2006.

MERZA, J., MALLET, S., LITAUDON, M., DUMONTET, V., SERAPHIN, D., RICHOMME, P. New cytotoxic guttiferone analogues from *Garcinia virgata* from New Caledonia. **Planta Med.**, v. 72, p. 87-89, 2006.

METCALFE, C. D. Testes for Predicting Carcinogenicity in Fish. **CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences**, v. 1, p. 111-129, 1989.

MOLIN, M. M. D., **Isolamento, identificação e avaliação farmacologia de extratos, frações e compostos obtidos das partes aéreas da *Garcinia achachairu* Rusby (*Clusiaceae*)**, 2009, 81 fl. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2009.

MONTEITH, D. K.; VANSTONE, J. Comparison of the Microgel Electrophoresis Assay and other Assays for Genotoxicity in the Detection of DNA Damage. **Mutation Research – Genetic Toxicology**, v. 345, p. 97-103, 1995.

NGOUELA, S., LENTA, B. N., NOUNGOUE, D. T., NGOUPAYO, J., BOYOM, F. F., TSAMO, E., GUT, J., ROSENTHAL, P. J., CONNOLLY, J. D. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. **Phytochemistry**, v. 67, n. 3, p. 302-6, Feb 2006.

OECD 420, 2001. **Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 420, Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure.** Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL420.pdf. Acesso em: 17/11/2011.

OLIVE, P. L., BANÁTH, J. P., DURAND, R. E. Heterogeneity in radiatio-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, Oak Brook, v. 122, p. 86-94, 1990.

OSTLING, O., JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PAGES, V., FUCHS, R. P. How DNA lesions are turned into mutations within cells? **Oncogene**, v. 21, n. 58, p. 8957-66, Dez 2002.

PANA, E., CAO, S., BRODIE, P. J., MILLER, J. S., RAKOTODRAJAONA, R., RATOVOSON, F., BIRKINSHAW, C., ANDRIANTSIFERANA, R., RASAMISON, V. E., KINGSTON, D. G. An antiproliferative xanthone of *Symphonia pauciflora* from the Madagascar rainforest. **Natural product communications**, v. 5, n. 5, p. 751-4, Mai 2010.

PANDRANGI, R., PETRAS, M., RALPH, S., VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 26, p. 345-356, 1995.

PANTHONG, K., PONGCHAROEN, W., PHONGPAICHIT, S., TAYLOR, W. C. Tetraoxygenated xanthones from the fruits of *Garcinia cowa*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 999-1004, Mai 2006.

PFUHLER, S. et al. In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: summary of an IWGT workshop. **Mutation research**, v. 723, n. 2, p. 101-7, Ago 2011.

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

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. L. R., MONTELONE-NETO, R. **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto – SP. 100 SBG – Revista Brasileira de Genética, p.83-89, 1991.

RABELLO-GAY, M. NAZARETH. Genética toxicológica: bases e metas. In: ALMEIDA, WALDEMAR F. DE; REYES, FELIX G.R; ALMEIDA, MARIA ELISA W. DE. **Ecotoxicología y seguridad química**. Metepec, ECO, p. 323-328, 1987.

RADMAN, M., MATIC, I., HALLIDAY, J. A., TADDEI, F. Editing DNA replication and recombination by mismatch repair: from bacterial genetics to mechanisms of predisposition to cancer in humans. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 347, n. 1319, p. 97-103, Jan 1995.

RIBEIRO, J. C. ANTUNES, L. M. AISSA, A. F. DARIN, J. D. DE ROSSO, V. V. MERCADANTE, A. Z. BIANCHI MDE, L. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation research**, v. 695, n. 1-2, p. 22-8, Jan 2010.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K.; **Mutagênese Ambiental** . Canoas: Ed. ULBRA, 2003. 356 p.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 722, p. 225-254, 1999.

RYDBERG, B., JOHANSON, K. J. Estimation of single strand break in single mammalian cells in: P. C. Hanawalt, E. C. Friedbers, C. F. Fox (Eds). **DNA Repair Mechanisms**. New York. p. 465, 1978.

SASAKI, Y. F., IZUMIYAMA, F., NISHIDATE, E., ISHIBASHI, S., TSUDA, S., MATSUSAKA, N., ASANO, N., SAOTOME, K., SOFUNI, T., HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 393, p. 133-139, 1997.

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

SHIBATA, M. A., IINUMA, M., MORIMOTO, J., KUROSE, H., AKAMATSU, K., OKUNO, Y., AKAO, Y., OTSUKI, Y. alpha-Mangostin extracted from the pericarp of the

mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn) reduces tumor growth and lymph node metastasis in an immunocompetent xenograft model of metastatic mammary cancer carrying a p53 mutation. **BMC medicine**, v. 9, p. 69, 2011.

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.

SZETO, Y. T., WONG, S. C., WONG, J. W., KALLE, W., PAK, S. C. In vitro antioxidation activity and genoprotective effect of selected Chinese medicinal herbs. **The American journal of Chinese medicine**, v. 39, n. 4, p. 827-38, 2011.

TAHER, M., IDRIS, M. S., AHMAD, F., ARBAIN, D. A polyisoprenylated ketone from *Calophyllum enervosum*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 6, p. 723-6, Mar 2005.

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. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000.

VALENTIN-SEVERIN, I., LE HEGARAT, L., LHUGUENOT, J. C., LE BON, A. M., CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, n.536, p. 79-90, 2003.

WANG, J. J., SANDERSON, B. J., ZHANG, W. Cytotoxic effect of xanthenes from pericarp of the tropical fruit mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) on human melanoma cells. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 49, n. 9, p. 2385-91, Set 2011.

WASSON, G. R., MCKELVEY-MARTIN, V. J., DOWNES, C. S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 153-62, Mai 2008.

WILLIAMS R. B., HOCH J., GLASS T. E., EVANS R., MILLER J.S., WISSE J.H., KINGSTON, D.G. A Novel Cytotoxic Guttiferone Analogue from *Garcinia macrophylla* from the Suriname Rainforest. **Planta Med.**, v. 69, p. 864–866, 2003.

WILLIAMS, R. C.; METCALFE, C. D. Development of an in vitro Hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 23, p. 193-202, 1992.

WU, C. C., WENG, J. R., WON, S. J., LIN, C. N. Constituents of the pericarp of *Garcinia subelliptica*. **Journal of natural products**, v. 68, n. 7, p. 1125-7, Jul 2005.

4-ARTIGO

Genotoxicity assessment of *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells *in vivo*

Artigo submetido ao “*Journal of ethnopharmacology*”

Genotoxicity assessment of *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells *in vivo*

Eduardo de Souza Marques^a, Suellen Silva^b, Rivaldo Niero^b, Sérgio Faloni de Andrade^b,
Edson Luis Maistro^{a,c*}

Affiliation

^a Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Botucatu, SP, Brazil

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

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

Correspondence

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

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Garcinia achachairu* Rubsy (Clusiaceae) is popularly known as "achachairu", and is used in folk Bolivian medicine for its healing, digestive, and laxative properties, and in the treatment of gastritis, rheumatism and inflammation. Despite its widespread therapeutic use, there is a lack of data regarding its *in vivo* genotoxic effects. Therefore, in this study, we used the comet assay and the micronucleus test, respectively, to evaluate the possible genotoxic and clastogenic effects of *Garcinia achachairu* seed extract (GAE) on different cells of mice.

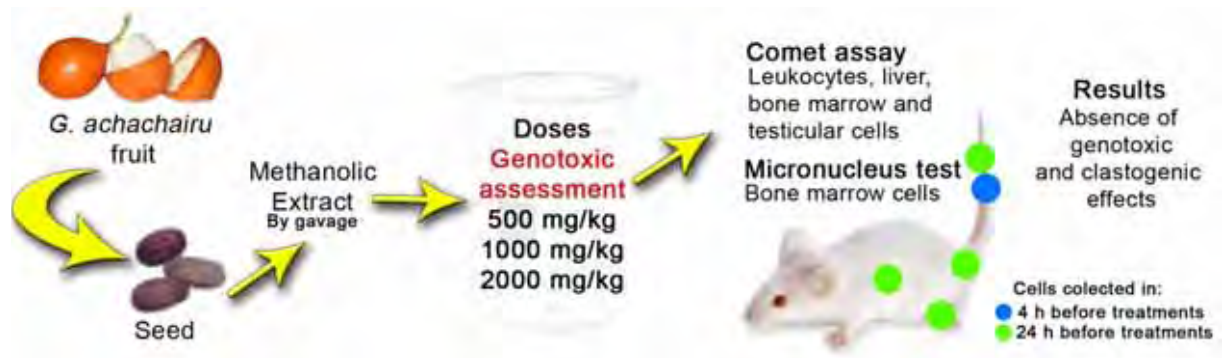
Material and methods: The GAE was administered by oral gavage at doses of 500, 1000 and 2000 mg/kg. For the analysis, the comet assay was performed on the leukocytes (collected 4 and 24 hours after treatment), liver, bone marrow and testicular cells (collected 24 hours after treatment), and the micronucleus test (MN) on bone marrow cells. Cytotoxicity was assessed by scoring 200 consecutive polychromatic (PCE) and normochromatic (NCE) erythrocytes (PCE/NCE ratio).

Results and conclusion: The results showed that GAE did not induce significant DNA damage in leukocytes (4h and 24 h samples), liver, bone marrow and testicular cells (24 h samples). Neither did they show any significant increase in micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) at the three tested doses. The PCE/NCE ratio indicated no cytotoxicity. Under our experimental conditions, the data obtained suggest that a single oral administration of *G. achachairu* extract does not cause genotoxicity and clastogenicity in different cells of mice.

Keywords

Garcinia achachairu, Clusiaceae, Comet assay, Micronucleus test, Guttiferone A.

Graphical abstract



1. Introduction

Preparations of medicinal plants are widely used in human therapy. Since in nature, some plants synthesize toxic chemicals, apparently as a primary defense mechanism against bacteria, fungi, insects and other animal predators, and in-depth studies on their potential risks to human health are necessary.

Garcinia achachairu Rusby (Clusiaceae) is a plant belonging to the genus *Garcinia* – ex genus *Rheedia* - popularly known as "*achachairu*". This plant is used in Bolivian folk medicine for its healing, digestive, and laxative properties, and for the treatment of gastritis, rheumatism and inflammation (Barbosa and Artiole, 2007). Some species of this genus have different chemical constituents, such as benzophenones and biflavonoids, with great importance for the pharmaceutical industries due to the wide spectrum of biological activities of these compounds. Its activities include cytopathic inhibition of *in vitro* HIV infection; free radical scavenging; iNOS and COX-2 expression inhibition in carcinoma of the colon; induction of apoptosis, and antiulcer, antioxidant and trypanocidal properties (Martins et al., 2007). Recently, in our laboratories, we have demonstrated that the seed extract, fractions and a pure compound named Guttiferone A have important antinociceptive activity in different experimental models in mice (Molin et al., 2011).

According to the literature, using the comet assay and micronucleus test, it is possible to evaluate the potential genotoxicity of many compounds through *in vitro* and *in vivo* models (Aquino et al., 2011; Melo-Cavalcante et al., 2011; Ribeiro et al., 2010; Rodrigues et al., 2009). These assays have achieved the status of standard tests in the battery of tests used to assess the safety of novel pharmaceuticals or other chemicals (Candido-Bacani Pde et al., 2011). To our knowledge, there have been no previous studies investigating the genetic toxicity of plants belonging to the *Garcinia* genus. Therefore, the present study was

undertaken to investigate the genotoxic and clastogenic potential of *Garcinia achachairu* seed extract (GAE) on different cells of mice using the comet and micronucleus assays, respectively.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The material (leaves, seeds and branches) of *G. achachairu* were collected separately in Camboriú, Santa Catarina, in March 2007 and identified by Dr. Oscar B. Iza (Department of Botany, University of Vale do Itajaí). A voucher specimen was deposited at the Barbosa Rodrigues Herbarium (Itajaí-SC) under number HBR 52637. In this work, only the extract prepared from the seeds was used.

2.2. Extract preparation

Air-dried and powdered seeds (250g) of *G. achachairu* were extracted at room temperature by maceration with methanol (2x 1000mL) for seven days. The extracted material was filtered and concentrated under reduced pressure by rotatory evaporator, yielding 9.01g (3.6%) of crude methanol seed extract.

2.3. Chemicals

Doxorubicin (DXR, Oncodox®, Meizler) was used as the DNA damage agent in the comet and micronucleus assays, and was prepared by dissolving it in sterile water. The other main chemicals were obtained from the following suppliers: normal melting point (NMP)

agarose (Cat. No. 15510–019: Invitrogen) low melting point (LMP) agarose (Cat. No. 15517–014: Invitrogen), sodium salt *N*-lauroyl sarcosine (L-5125: Sigma) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck). GAE was dissolved in 1% DMSO (Dimethyl sulfoxide).

2.4. *Animals and dosing*

Experiments were carried out on 10-week-old male albino Swiss mice (*Mus musculus*),

weighing 25–30 g. The animals were acquired from the biotermium of the Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo state, Brazil, and kept in polyethylene

boxes, in a climate-controlled environment (25 ± 4 °C, $55 \pm 5\%$ relative humidity) with a 12 h

light–dark cycle (7:00 a.m. to 7:00 p.m.). Food (NUVILAB CR1-NUVITAL) and water were

available *ad libitum*. The mice were divided into five experimental groups of six animals each. GAE was diluted in 1% DMSO and administered in a single dose of 0.5 mL by gavage

at concentrations of 500, 1000 and 2000 mg/kg body weight, chosen on the basis of our acute toxicity studies in mice, which was higher than 2000 mg/kg, and following the limit dose recommended by OECD 420 (2001) for acute treatments in toxicology assays. The negative control group received subcutaneous injection of 1% DMSO. The positive control group received an intraperitoneal injection of doxorubicin at 80 mg/kg body weight. The animals used in this study were sacrificed by cervical dislocation without anesthesia to avoid possible alterations in the DNA damage analysis. The Animal Bioethics Committee of the Faculdade de Medicina de Marília (CEP/FAMEMA, Marília, São Paulo state, Brazil) approved the present study on 26 February 2010 (protocol number 780/09), in accordance with federal government legislations on animal care.

2.5. Comet assay

The comet assay (SCGE) was carried out by the method described by Speit and Hartmann (1999), which is based on the original work of Singh et al. (1988) and includes modifications introduced by Klaude et al. (1996) as well as additional modifications. Peripheral blood samples from the tail vein were obtained from six Swiss mice of each group, 4 h and 24 h after treatment, before euthanasia. After the animals' sacrifice, liver, bone marrow, and testicle cells samples were washed in saline solution, in an ice bath. A small portion (about 4 mm in diameter) was transferred to a Petri dish containing 1 ml of Hank's solution (pH 7.5) and then homogenized gently with a small pair of tweezers and a syringe to avoid clumps of cells. An aliquot of 20 μ l was removed from the supernatant of each cell type to determine cell viability. Cell counting was performed using a hemocytometer. Cell viability

was determined by trypan blue dye exclusion. The number of trypan blue-negative cells was considered the number of viable cells, and was greater than 85%. Another equal aliquot of cells from each animal was mixed with 120 μ l of 0.5% low melting point agarose at 37 °C, and rapidly spread onto two microscope slides per animal, precoated with 1.5% normal melting point agarose. The slides were coverslipped and allowed to gel at 4 °C for 20 min. The coverslips were gently removed and the slides were then immersed in cold, freshly prepared lysis solution consisting of 89 ml of a stock solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH set to 10.0 with ~ 8 g solid NaOH, 890 ml of distilled water and 1% sodium lauryl sarcosine), plus 1 ml of Triton X-100 (Merck) and 10 ml of DMSO (Merck). The slides, which were protected from light, were allowed to stand at 4 °C for 1 h and then placed in the gel box, positioned at the anode end, and left in a high pH (>13) electrophoresis buffer (300 mM NaOH–1 mM EDTA, prepared from a stock solution of 10 M NaOH and 200 mM, pH 10.0, EDTA) at 4 °C for 20 min prior to electrophoresis, to allow DNA unwinding. The electrophoresis run was carried out in an ice bath (4 °C) for 20 min at 300 mA and 25 V (0.722 V cm⁻¹). The slides were then submerged in a neutralization buffer (0.4 M Tris–HCl, pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature and fixed in 100% ethanol for 10 min. The slides were dried and stored overnight or longer, before staining. For the staining process, the

slides were briefly rinsed in distilled water, covered with 30 μ l of 1 \times ethidium bromide staining solution prepared from a 10 \times stock (200 μ g ml⁻¹) and coverslipped. The material was evaluated immediately at 400 \times magnification, using a fluorescence microscope (Olympus BX 50) with a 515–560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter. Only individual nucleoids were scored. The extent and distribution of DNA damage indicated by the SCGE assay was evaluated by examining at least 100 randomly selected and non-overlapping cells (50 cells per coded slide) per animal in a blind analysis (six mice per group). These cells were scored visually, according to tail size, into the following four classes: class 0, no tail; class 1, tail shorter than the diameter of the head (nucleus); class 2, tail length 1–2 times the diameter of the head; and class 3, tail length more than twice the diameter of the head. Comets with no heads, with nearly all of the DNA in the tail or with a very wide tail were excluded from the evaluation because they probably represented dead cells (Hartmann and Speit, 1997). The total score for 100 comets, which ranged from 0 (all undamaged) to 300 (all maximally damaged), was obtained by multiplying the number of cells in each class by the damage class.

2.6. Bone marrow micronucleus test

The assay was carried out following standard protocols, as recommended by Schmid (1975) and Krishna and Hayashi (2000). The same six male mice from each group as those used in the comet assay were also used to this assay. The bone marrow from one femur was flushed out using 2 ml of saline (0.9% NaCl) and centrifuged for 7 min. The supernatant was discarded and smears were made on slides. The slides were coded for a ‘blind’ analysis, fixed with methanol and stained with Giemsa (Gollapudi and Kamra, 1979). For the analysis of the micronucleated cells, 2000 polychromatic erythrocytes (PCE) per animal were scored, to

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

2.7. Statistical analysis

After verifying for normal distribution (normality test KS performed). The data obtained from the comet assay were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the Tukey–Kramer multiple comparison test and the data obtained from the micronucleus assay were submitted to the analysis of variance test (ANOVA) with linear regression, using the GraphPad Prism® software (version 5.02) in both cases. The results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

The therapeutic use of natural products, including medicinal plants, has become increasingly prevalent. Many pharmacognostical and pharmacological investigations have been performed to identify lead compounds for drug development (Newman et al., 2003). Due to the biological activities of these compounds, evaluation of its genotoxic/mutagenic potential is essential (Bast et al., 2002; Rodeiro et al., 2006; Santos et al., 2007; Tice et al., 2000).

The present study evaluates the genotoxic property of GAE. The comet assay and micronucleus test are effective tests, in this context. The alkaline version of the comet assay was used in our study. This assay measures low levels of DNA damage, such as single and double strand breaks, alkali-labile sites, and DNA-DNA and DNA-protein crosslinks (Tice et al., 2000). Our results obtained by the single cell gel electrophoresis (comet) assay are presented in Figure 1, which shows the DNA damage (according to tail size) in leukocytes from peripheral blood cells (collected 4 and 24 h after treatment), and liver, bone marrow, and testicular cells (collected 24 h after GAE treatment). The cell viability for all the cells was greater than 85% using Trypan blue staining, which confirms the absence of cytotoxicity observed by the PCE/NCE ratio in the MN test. No death, morbidity or distinctive clinical signs were observed in the treated animals following GAE treatment. As expected, doxorubicin, the positive control, induced a significant increase in DNA migration in leukocytes ($p < 0.001$) when compared to the negative control, indicating the validity of the species selected, and of the study design in the detection of genotoxic effects. Our historical laboratory positive control using doxorubicin confirmed the results obtained. In all the analyzed cells, no increases in DNA damage ($p > 0.05$) were found between the negative control and experimental groups treated with three doses of GAE. When cells were exposed to three concentrations of the test compound, the majority of cells examined on slides did not show any DNA damage (class 0), with very few nucleoids presenting class 1 DNA damage. These findings suggest no genotoxic effects of the GAE on the cells analyzed.

The second cytogenetic assay performed in the present study was the micronucleus test. This *in vivo* assay is the primary test in a battery of genotoxicity tests recommended by the regulatory agencies worldwide. The assay measures clastogenicity (chromosome breakage) and aneugenicity (chromosome lagging due to mitotic apparatus dysfunction), and estimating the ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to normochromatic erythrocytes (NCE) is

useful in evaluating any perturbations in hematopoiesis as a result of animal treatment (Krishna and Hayashi, 2000; Gollapudi and McFadden, 1995). Our results for the micronucleus assay and PCE/NCE ratio determined after single gavage administration of three different doses of GAE in Swiss mice are shown in Table 1. There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) between the control and the groups treated with the three doses of GAE, indicating absence of the clastogenic/aneugenic effects of this extract. As expected, the animals treated with doxorubicin showed a high frequency of MNPCE in bone marrow cells when compared with the control ($p < 0.001$). The estimated ratio of PCE–NCE in bone marrow preparations showed no statistically significant alterations in hematopoiesis as a result of GAE treatment, indicating no cytotoxic effects. The results obtained in the micronucleus test are consistent with those observed by the comet assay.

Our literature review found no previous studies involving the evaluation of the genotoxic potential of the *Garcinia* or *Rheedia* extracts. Nevertheless, several species of this genus showed the presence of benzophenones, xanthenes and bioflavonoids as main constituents (Deachathai et al., 2006; Lannang et al., 2010; Panthong et al., 2006), and, for some of these compounds, there are genotoxic and antigenotoxic studies. In previous phytochemical characterization of the *G. achachairu* seed extract, we revealed the presence of these constituents, and guttiferone A as majority compound (Molin et al., 2011).

Almanza et al. (2011) reported that the benzophenone acuminophenone A, and the xanthenes formoxanthone C and macluraxanthone isolated from *Rheedia acuminata* showed no mutagenicity on several *Salmonella typhimurium* strains, but on the other hand, these compounds promoted a strong reduction of mutagenic effect induced by hydrogen peroxide.

In the present study we observed the absence of genotoxicity of the *G. achachairu* seeds extract. Our results are in agreement with the above mentioned study that analyzed some of the main compounds found in the *Garcinia* extract.

In conclusion, the present results demonstrate that under our experimental conditions, *Garcinia achachairu* seeds extract is not genotoxic or clastogenic even considering the high doses tested. These results represent a positive step forward in determining the safe use of these plants in traditional and folk medicine. In the ethnopharmacological context, the lack of toxicity and genotoxicity of this extract is important for the whole population, since the rate of cancer, as well as diseases caused by genotoxic agents, is increasing worldwide.

Acknowledgements

E.S. Marques thanks CAPES for a Master's scholarship and Patrícia C. Martins Mello for her technical assistance.

References

- Almanza, G.R., Quispe, R., Mollinedo, P., Rodrigo, G., Fukushima, O., Villagomez, R., Akesson, B., Sterner, O., 2011. Antioxidant and antimutagenic polyisoprenylated benzophenones and xanthenes from *Rheedia acuminata*. *Nat Prod Commun* 6, 1269-74.
- Aquino, I., Perazzo, F.F., Maistro, E.L., 2011. Genotoxicity assessment of the antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 49, 1335-1339.
- Barbosa, W., Article F.A., 2007. "A fruta achachairú." Available at http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/achachairu/index.htm. [Accessed November 9, 2011].
- Bast, A., Chandler, R.F., Choy, P.C., Delmulle, L.M., Gruenwald, J., Halkes, S.B., Keller, K., Koeman, J.H., Peters, P., Przyrembel, H., de Ree, E.M., Renwick, A.G., Vermeer, I.T., 2002. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. *Environ Toxicol Pharmacol* 12, 195-211.
- Candido-Bacani Pde, M., dos Reis, M.B., Serpeloni, J.M., Calvo, T.R., Vilegas, W., Varanda, E.A., Colus, I.M., 2011. Mutagenicity and genotoxicity of isatin in mammalian cells in vivo. *Mutation research* 719, 47-51.
- Deachathai, S., Mahabusarakam, W., Phongpaichit, S., Taylor, W.C., Zhang, Y.J., Yang, C.R., 2006. Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry* 67, 464-469.
- Gollapudi, B., Kamra, O.P., 1979. Application of a simple giemsa-staining method in the micronucleus test. *Mutation research* 64, 45-46.
- Gollapudi, B.B., McFadden, L.G., 1995. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation research* 347, 97-99.
- Hartmann, A., Speit, G., 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett* 90, 183-188.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnstrom, G., 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation research* 363, 89-96.
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation research* 455, 155-166.
- Lannang, A.M., Louh, G.N., Biloa, B.M., Komguem, J., Mbazona, C.D., Sondengam, B.L., Naesens, L., Pannecouque, C., De Clercq, E., Sayed El Ashry el, H., 2010. Cytotoxicity of natural compounds isolated from the seeds of *Garcinia afzelii*. *Planta Med* 76, 708-712.

Martins, F.T., Cruz Jr. J.W., Derogis P.B.M.C., dos Santos M.H., Veloso M.P., Ellena J., Doriguetto A.C., 2007. Natural polyprenylated benzophenones: keto-enol tautomerism and stereochemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 1515-1523.

Melo-Cavalcante, A.A., Dantas, S.M., Leite Ade, S., Matos, L.A., e Sousa, J.M., Picada, J.N., da Silva, J., 2011. In vivo antigenotoxic and anticlastogenic effects of fresh and processed cashew (*Anacardium occidentale*) apple juices. *J Med Food* 14, 792-798.

Molin, M. M. D., Silva, S., Alves, D., Quintao, N. L., D. M., Franco, [C. F., Valdir](#), Niero, R., 2012. Phytochemical analysis and antinociceptive properties of *Garcinia achachairu* Rusby (*Clusiaceae*) seeds. *Archives of Pharmacal Research*. (Print).

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66, 1022-1037.

OECD 420, 2001. "Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 420, Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure". Available at http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL420.pdf. [Accessed November 9, 2011].

Panthong, K., Pongcharoen, W., Phongpaichit, S., Taylor, W.C., 2006. Tetraoxygenated xanthenes from the fruits of *Garcinia cowa*. *Phytochemistry* 67, 999-1004.

Ribeiro, J.C., Antunes, L.M., Aissa, A.F., Darin, J.D., De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., Bianchi Mde, L., 2010. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutation research* 695, 22-28.

Rodeiro, I., Cancino, L., Gonzalez, J.E., Morffi, J., Garrido, G., Gonzalez, R.M., Nunez, A., Delgado, R., 2006. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 44, 1707-1713.

Rodrigues, C.R., Dias, J.H., de Mello, R.N., Richter, M.F., Picada, J.N., Ferraz, A.B., 2009. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *J Ethnopharmacol* 125, 97-101.

Santos, J.L., Varanda, E.A., Lima L.M., Chin, C.M., 2007. Avaliação da atividade mutagênica da talidomida pelo teste de Ames. *Rev Eletr Farm* 4, 154–158.

Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation research* 31, 9-15.

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.

Sokal, R.R., Rohlf F.J. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, third ed. W.H. Freeman and Company, New York, pp. 175 –205, 404–486.

Speit, G., Hartmann, A., (1999) *The Comet Assay (Single-Cell Gel Test)*. in: Henderson, D.S. (Ed.), *Methods in Molecular Biology, DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems*. Humana Press Inc., Totowa, pp. 203–212.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis* 35, 206-221.

Figure 1 Effect of *Garcinia achachairu* extract (GAE) in different cells of mice by comet assay. * $p < 0.001$ (ANOVA/Tukey post-test) when compared to negative control. Data are expressed as the mean values obtained from six mice per group ($n = 6$); Score = DNA damage index.

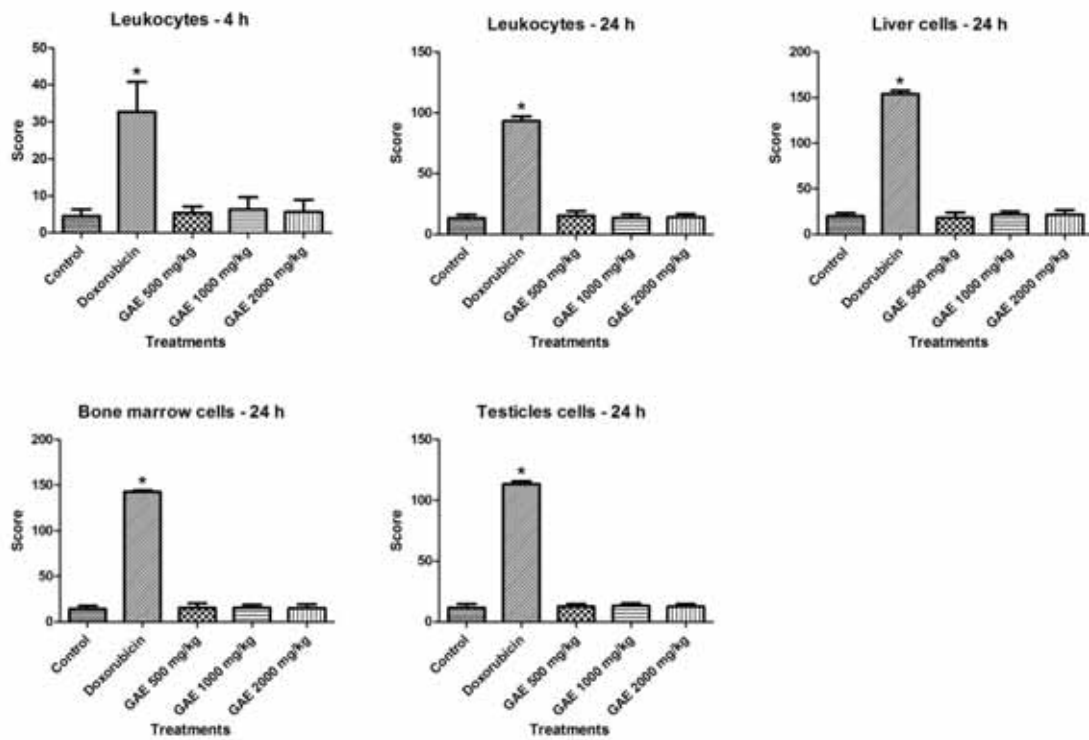


Table 1. Number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) observed in the bone marrow cells of male (M) Swiss mice treated with *Garcinia achachairu* extract (GAE), and respective controls.

Treatments	Number of MNPCE per Animal						MNPCE Mean \pm SD	PCE/NCE Mean \pm SD
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆		
Control (DMSO 1%)	4	3	4	5	3	4	3.83 \pm 0.68	1.25 \pm 0.16
Doxorubicin (80 mg/kg)	23	18	20	17	17	22	19.5 \pm 2.36*	1.38 \pm 0.24
GAE (500 mg/kg)	4	5	4	4	3	4	4.00 \pm 0.57	1.40 \pm 0.23
GAE (1000 mg/kg)	3	3	3	4	3	3	3.16 \pm 0.37	1.33 \pm 0.20
GAE (2000 mg/kg)	5	4	3	3	4	3	3.66 \pm 0.74	1.24 \pm 0.14

*Significantly different from control (p < 0.001).

Were analyzed two thousand cells per animal. SD = standard deviation of the mean.

ANEXOS

Artigo Submetido: “ *Genotoxicity assessment of Garcinia achachairu Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells in vivo*” ao *Journal of Ethnopharmacology*

----- Mensagem encaminhada -----

De: "Journal of Ethnopharmacology" <jethnoph@chem.leidenuniv.nl>
Para: "edson maistro" <edson.maistro@marilia.unesp.br>
Enviadas: Segunda-feira, 26 de Dezembro de 2011 10:04:25
Assunto: Submission Confirmation for your paper

Dear Dr.Maistro,

Your submission entitled "Genotoxicity assessment of Garcinia achachairu Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells in vivo." has been received by journal Journal of Ethnopharmacology

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

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

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

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

Parecer do Comitê de Ética Experimental da Faculdade de Medicina de Marília, SP



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

Marília, 26 de Fevereiro de 2010

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

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Marília, recebeu o protocolo de estudo nº 780/09, intitulado: "Estudo do Potencial Genotóxico e Antigenotóxico do Extrato de Garcinia Achachairu em Diferentes Células Somáticas de Camundongos in Vivo", foi considerado **APROVADO "Ad Referendum"** após responder as pendências apontadas em Reunião Ordinária – 14/12/09, de acordo com a Resolução 196/96 e suas Complementares do Conselho Nacional de Saúde, podendo ser iniciado

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

Atenciosamente,

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

Table 1 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Garcinia achachairu* extract in peripheral blood cells (collected 4 h after treatment) from male Swiss mice (M) *in vivo*.

Treatments		Animals	Total ¹	Comet class			Scores
				0	1	2	
Control	M ₁	3	97	3	0	0	3
	M ₂	2	98	2	0	0	2
	M ₃	4	92	4	0	0	4
	M ₄	5	95	5	0	0	5
	M ₅	6	91	6	0	0	6
	M ₆	7	93	7	0	0	7
	Mean ± SD	4.50 ± 1.70					
GAE (500 mg/kg)	M ₁	5	95	5	0	0	5
	M ₂	6	94	6	0	0	6
	M ₃	3	97	3	0	0	3
	M ₄	8	92	8	0	0	8
	M ₅	4	96	4	0	0	4
	M ₆	6	94	6	0	0	6
	Mean ± SD	5.30 ± 1.59					
GAE (1000 mg/kg)	M ₁	6	94	6	0	0	6
	M ₂	5	95	5	0	0	5
	M ₃	4	96	4	0	0	4
	M ₄	8	92	8	0	0	8
	M ₅	11	89	10	1	0	12
	M ₆	3	97	3	0	0	3
	Mean ± SD	6.16 ± 2.67					
GAE (2000 mg/kg)	M ₁	1	99	1	0	0	1
	M ₂	5	95	5	0	0	5
	M ₃	10	90	9	1	0	11
	M ₄	5	95	5	0	0	5
	M ₅	7	93	7	0	0	7
	M ₆	5	95	5	0	0	5
	Mean ± SD	5.50 ± 2.69					
Doxorubicin (80 mg/kg)	M ₁	33	67	25	7	1	42
	M ₂	24	76	21	3	0	27
	M ₃	35	65	27	7	1	44
	M ₄	24	76	21	3	0	27
	M ₅	25	75	20	5	0	30
	M ₆	24	76	22	2	0	26
	Mean ± SD	27.5 ± 4.64*					

*Significantly different from the negative control (P<0.001);

¹Total number of cells with damage (class 1+2+3).

Table 2 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Garcinia achachairu* extract in peripheral blood cells (collected 24 h after treatment) from male Swiss mice (M) *in vivo*.

Treatments	Animals	Total ¹	Comet class				Scores
			0	1	2	3	
Control	M ₁	13	87	13	0	0	13
	M ₂	15	85	15	0	0	15
	M ₃	15	85	15	0	0	15
	M ₄	17	83	17	0	0	17
	M ₅	11	89	11	0	0	11
	M ₆	10	90	10	0	0	10
	Mean ± SD	13.50 ± 2.43					13.50 ± 2.43
GAE (500 mg/kg)	M ₁	16	84	16	0	0	16
	M ₂	11	89	11	0	0	11
	M ₃	19	81	18	1	0	20
	M ₄	15	85	15	0	0	15
	M ₅	12	88	12	0	0	12
	M ₆	18	82	17	1	0	19
	Mean ± SD	15.16 ± 2.91					15.5 ± 3.30
GAE (1000 mg/kg)	M ₁	17	83	17	0	0	17
	M ₂	12	88	12	0	0	12
	M ₃	13	87	13	0	0	13
	M ₄	9	91	9	0	0	9
	M ₅	17	83	17	0	0	17
	M ₆	14	86	14	0	0	14
	Mean ± SD	13.66 ± 2.80					13.66 ± 2.80
GAE (2000 mg/kg)	M ₁	11	89	11	0	0	11
	M ₂	13	87	13	0	0	13
	M ₃	13	87	13	0	0	13
	M ₄	15	85	15	0	0	15
	M ₅	14	86	14	0	0	14
	M ₆	18	82	17	1	0	19
	Mean ± SD	14.00 ± 2.16					14.16 ± 2.47
Doxorubicin (80 mg/kg)	M ₁	77	23	65	7	5	94
	M ₂	80	20	66	10	4	98
	M ₃	76	24	63	8	5	94
	M ₄	76	24	68	5	3	87
	M ₅	78	22	68	7	3	91
	M ₆	79	21	65	11	3	96
	Mean ± SD	77.66 ± 1.49*					93.33 ± 3.54*

*Significantly different from the negative control (P<0.001);

¹Total number of cells with damage (class 1+2+3).

Table 3 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Garcinia achachairu* extract in liver cells (collected 24 h after treatment) from male Swiss mice (M) *in vivo*.

Treatments	Animals	Total ¹	Comet class				Scores
			0	1	2	3	
Control	M ₁	23	77	22	1	0	24
	M ₂	21	79	21	0	0	21
	M ₃	22	78	22	0	0	22
	M ₄	17	83	17	0	0	17
	M ₅	15	85	15	0	0	15
	M ₆	21	79	20	1	0	22
	Mean ± SD	19.83 ± 2.85					20.16 ± 3.13
GAE (500 mg/kg)	M ₁	13	87	13	0	0	13
	M ₂	15	85	15	0	0	15
	M ₃	21	79	21	0	0	21
	M ₄	19	81	19	0	0	19
	M ₅	27	73	26	1	0	28
	M ₆	14	86	14	0	0	14
	Mean ± SD	18.16 ± 4.84					18.33 ± 5.15
GAE (1000 mg/kg)	M ₁	19	81	19	0	0	19
	M ₂	23	77	22	1	0	24
	M ₃	27	73	26	1	0	28
	M ₄	20	80	20	0	0	20
	M ₅	20	80	20	0	0	20
	M ₆	18	20	18	0	0	18
	Mean ± SD	21.16 ± 3.02					21.50 ± 3.45
GAE (2000 mg/kg)	M ₁	21	79	21	0	0	21
	M ₂	19	81	19	0	0	19
	M ₃	23	77	23	0	0	23
	M ₄	28	72	27	1	0	29
	M ₅	24	76	23	1	0	25
	M ₆	14	86	14	0	0	14
	Mean ± SD	21.50 ± 4.34					21.83 ± 4.70
Doxorubicin (80 mg/kg)	M ₁	91	9	44	38	9	147
	M ₂	96	4	46	40	10	156
	M ₃	95	5	46	37	12	156
	M ₄	90	10	41	32	17	156
	M ₅	91	9	42	34	15	155
	M ₆	94	6	44	40	10	154
	Mean ± SD	92.83 ± 2.26*					154.00 ± 3.21*

*Significantly different from the negative control (P<0.001);

¹Total number of cells with damage (class 1+2+3).

Table 4 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Garcinia achachairu* extract in bone marrow cells (collected 24 h after treatment) from male Swiss mice (M) *in vivo*.

Treatments		Comet class					Scores
		Animals	Total ¹	0	1	2	
Control	M ₁	14	86	14	0	0	14
	M ₂	19	81	18	1	0	20
	M ₃	16	84	16	0	0	16
	M ₄	13	87	13	0	0	13
	M ₅	11	89	11	0	0	11
	M ₆	12	88	12	0	0	12
	Mean ± SD	14.16 ± 2.67					14.33 ± 2.98
GAE (500 mg/kg)	M ₁	20	80	19	1	0	21
	M ₂	15	85	15	0	0	15
	M ₃	10	90	10	0	0	10
	M ₄	17	83	17	0	0	17
	M ₅	19	81	18	1	0	20
	M ₆	10	90	10	0	0	10
	Mean ± SD	15.16 ± 3.97					15.50 ± 4.34
GAE (1000 mg/kg)	M ₁	17	83	17	0	0	17
	M ₂	19	81	18	1	0	20
	M ₃	13	87	13	0	0	13
	M ₄	18	82	18	0	0	18
	M ₅	14	86	14	0	0	14
	M ₆	13	87	13	0	0	13
	Mean ± SD	15.66 ± 2.42					15.83 ± 2.67
GAE (2000 mg/kg)	M ₁	16	84	16	0	0	16
	M ₂	22	78	21	1	0	23
	M ₃	10	90	10	0	0	10
	M ₄	14	86	14	0	0	14
	M ₅	21	79	20	1	0	12
	M ₆	15	85	15	0	0	15
	Mean ± SD	16.33 ± 4.10					16.66 ± 4.53
Doxorubicin (80 mg/kg)	M ₁	94	6	51	39	4	141
	M ₂	91	9	44	42	5	143
	M ₃	96	4	50	42	4	146
	M ₄	93	7	47	43	3	142
	M ₅	91	9	43	45	3	142
	M ₆	93	7	47	44	2	141
	Mean ± SD	93.00 ± 1.73*					142.50 ± 1.70*

*Significantly different from the negative control (P<0.001);

¹Total number of cells with damage (class 1+2+3).

Table 5 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Garcinia achachairu* extract in testicles cells (collected 24 h after treatment) from male Swiss mice (M) *in vivo*.

Treatments	Animals	Total ¹	Comet class				Scores
			0	1	2	3	
Control	M ₁	9	91	9	0	0	9
	M ₂	13	87	13	0	0	13
	M ₃	17	83	17	0	0	17
	M ₄	11	89	11	0	0	11
	M ₅	11	89	11	0	0	11
	M ₆	10	90	10	0	0	10
	Mean ± SD	11.83 ± 2.60					11.83 ± 2.60
GAE (500 mg/kg)	M ₁	16	84	16	0	0	16
	M ₂	11	89	11	0	0	11
	M ₃	12	88	12	0	0	12
	M ₄	14	86	14	0	0	14
	M ₅	11	89	11	0	0	11
	M ₆	13	87	13	0	0	13
	Mean ± SD	12.83 ± 1.77					12.83 ± 1.77
GAE (1000 mg/kg)	M ₁	13	87	13	0	0	13
	M ₂	11	89	11	0	0	11
	M ₃	17	83	17	0	0	17
	M ₄	13	87	13	0	0	13
	M ₅	11	89	11	0	0	11
	M ₆	14	86	14	0	0	14
	Mean ± SD	13.16 ± 2.03					13.16 ± 2.03
GAE (2000 mg/kg)	M ₁	10	90	10	0	0	10
	M ₂	15	85	15	0	0	15
	M ₃	14	87	14	0	0	14
	M ₄	11	89	11	0	0	11
	M ₅	14	86	14	0	0	14
	M ₆	12	88	12	0	0	12
	Mean ± SD	12.66 ± 1.79					12.66 ± 1.79
Doxorubicin (80 mg/kg)	M ₁	85	15	62	19	4	112
	M ₂	88	12	63	24	1	114
	M ₃	83	17	59	20	4	111
	M ₄	88	12	61	25	2	117
	M ₅	89	11	64	24	1	115
	M ₆	85	15	62	20	3	111
	Mean ± SD	86.33 ± 2.13*					113.33 ± 2.21*

*Significantly different from the negative control (P<0.001);

¹Total number of cells with damage (class 1+2+3).