



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA - MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E
ANTIGENOTÓXICA DE *CELTIS IGUANAEA* (JACQ.)
SARGENT EM BACTÉRIAS E CAMUNDONGOS**

FLAVIO FERNANDES VELOSO BORGES

GOIÂNIA
2010

FLAVIO FERNANDES VELOSO BORGES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E
ANTIGENOTÓXICA DE *CELTIS IGUANAEA* (JACQ.)
SARGENT EM BACTÉRIAS E CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lee Chen Chen

Goiânia

2010

"A única possibilidade de descobrir os limites do possível é aventurar-se além deles, adentrando o impossível."

Arthur C. Clarke

Dedico este trabalho à minha avó Maria Fernandes Guimarães.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Prof.^a Dr.^a Lee Chen Chen, por me orientar desde os primeiros meses da graduação, me propiciando muito mais do que apenas amadurecimento científico, mas também um aprendizado pessoal ímpar no âmbito das relações humanas e trabalho acadêmico. Agradeço imensamente pela confiança depositada, pelo conhecimento compartilhado, pela paciência dispensada, pelo companheirismo e, acima de tudo, pela amizade.

Aos professores da banca por dedicarem um pouco do seu tempo na análise desta dissertação, contribuindo com preciosas sugestões para o engrandecimento deste trabalho.

Aos meus pais pelo amor e por serem responsáveis pela minha formação, oferecendo todas as condições, seja financeira ou moral, que me permitiram alcançar esse objetivo.

Ao meu irmão Cleidson, pelo carinho, amizade e companheirismo que vão muito além de laços sanguíneos. Mano, sua simples presença muito me fortalece.

À minha namorada Mayra, por me acompanhar durante todo esse período, pelo conforto nos momentos desanimadores e por incentivar meus próximos passos. Agradeço também à família dela, por serem pessoas que sempre me incentivaram e torceram por mim.

A todos os docentes que me moldaram durante toda minha vida escolar. Não poderia deixar de citar vocês “mestres”, que do ensino fundamental e médio até a pós-graduação, nortearam minha jornada. Quero humildemente parafrasear as palavras de Isaac Newton: ‘Se hoje consigo enxergar mais longe, foi porque subi nos ombros de gigantes’. Agradeço em especial ao meu professor, educador e amigo Marcos das Neves (Tucano), e à toda ‘família’ Integrado Jaó por 3 anos muito especiais e de imensurável crescimento.

Ao Thiago, grande amigo de graduação, mestrado e de vida, pela ajuda com os experimentos, pelas divertidas conversas no laboratório, e por compartilhar vários desafios durante esses dois anos.

À todos os demais amigos e colegas do Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese, por tornarem o cotidiano tão agradável.

Aos colegas da turma de pós-graduação, pela troca engrandecedora de experiências e pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. Elson Alves Costa, por fornecer o extrato da planta utilizado neste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera, do Biotério central da UFG, pelo fornecimento dos camundongos utilizados neste estudo.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

À Universidade Federal de Goiás pela formação acadêmica e pelo espírito científico.

Aos amigos, por assim o serem.

À todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Plantas Medicinais e Fitoterapia	1
1.2 Cerrado	5
1.3 <i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sargent	9
1.4 Genética toxicológica	13
1.5 Induteste SOS - Teste de indução lisogênica em cepas de <i>E. coli</i>	24
1.6 Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos	28
2. OBJETIVOS	33
1.1 Objetivos Gerais	33
1.2 Objetivos Específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Extrato aquoso das folhas de <i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sargent	34
3.2 Materiais utilizados no Induteste SOS.....	34
3.3 Procedimento Experimental Induteste SOS	36
3.4 Materiais utilizados no Teste do Micronúcleo	37
3.5 Procedimento Experimental Teste do Micronúcleo	39
4. REFERÊNCIAS.....	41
5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	67
5.1 MANUSCRITO 1	68
Abstract.....	70
Resumo.....	71
1. Introduction.....	72
2. Material and Methods.....	74
2.1 <i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sargent extract (CIE)	74
2.2 Experimental procedure	75
2.3 Statistical analyses.....	76
3. Results	76

4. Discussion	78
5. Conclusion.....	81
6. Acknowledgements	81
7. References	81
5.2 MANUSCRITO 2	89
Abstract	91
1. Introduction.....	92
2. Material and Methods.....	94
2.1 Plant Material: <i>Celtis iguanaea</i> (Jacq.) Sargent extract.....	94
2.2 Animals.....	94
2.3 Experimental procedure	95
2.4 Statistical analysis	96
3. Results	96
4. Discussion	97
5. Conclusion.....	100
6. Acknowledgements	100
7. Author Disclosure Statement.....	101
8. References	101
6. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	111
7. ANEXOS	112
7.1 Gráficos dos resultados obtidos no Induteste SOS	112
7.2 Gráficos dos resultados obtidos no Teste do Micronúcleo	116

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução Geral

Figura 1. Abrangência geográfica das áreas contínuas e isoladas do Cerrado no Brasil, antes do processo de ocupação antrópica.

Figura 2. Representação da estimativa de cobertura vegetal nativa do Cerrado elaborada por Mantovani e Pereira (1998). Cada quadrícula da figura significa uma cena do satélite LandSat, onde estão representadas as variações na porcentagem de cobertura.

Figura 3. Distribuição Natural do gênero *Celtis* no mundo.

Figura 4. *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (Esporão de galo).; A - Árvore; B - Ramo; C - Espinho; D - Folhas; E - Flores; F - Fruto.

Figura 5. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 homens e mulheres estimadas para o ano 2010, segundo a Unidade da Federação - todas as Neoplasias.

Figura 6. Principais etapas da carcinogênese induzida por agentes químicos genotóxicos.

Figura 7. Molécula da MMC.

Figura 8. O comportamento oscilatório da resposta SOS. Em condições de crescimento não-induzidas, o repressor LexA liga-se a promotores SOS-controlados, limitando ou impedindo sua ação. Mediante danos ao DNA, filamentos de RecA são formados e ativam a autoclivagem do repressor LexA, permitindo a expressão dos genes SOS. A indução SOS é revertida quando os danos são reparados. Isto é devido ao desaparecimento do filamento RecA e permite que moléculas LexA recém-sintetizadas vinculem-se aos promotores SOS.

Figura 9. O ciclo de vida do bacteriófago λ . O bacteriófago se multiplica por uma via lítica ou lisogênica na bactéria *E. coli*. Quando o bacteriófago está crescendo em lisogenia, lesões na célula fazem com que o DNA viral integrado (profago) saia do cromossomo da célula hospedeira passando para o ciclo lítico

Figura 10. Formação de micronúcleo em eritroblasto. (a) ação do agente clastogênico com quebra cromossômica. (b) ação do agente no fuso mitótico.

Figura 11. Resumo do processo de maturação das células de linhagem eritrocitária.

Anexos

Figure 12. Survival fraction of the WP2s(λ) strain in relation to the CIE dose.

Figure 13. Induction Factor of the WP2s(λ) strain in relation to the CIE dose.

Figure 14. Survival Fraction of the WP2s(λ) strain in relation to the CIE dose co-treated with MMC.

Figure 15. Induction Factor of the WP2s(λ) strain in relation to the CIE dose co-treated with MMC.

Figure 16. MNPCE Frequencies after treatment with CIE extract.

Figure 17. PCE/NCE Ratio after treatment with CIE.

Figure 18. MNPCE Frequencies after simultaneous treatment with CIE extract and MMC (4 mg / Kg).

Figure 19. PCE/NCE Ratio after simultaneous treatment with CIE and MMC (4 mg / Kg).

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Table 1. Mean (m) and standard deviation (sd) of number of colonies (survival assessment) of *E. coli* WP2s(λ) and number of plaques (assessment of lysogenic induction) in RJF013 *E. coli* cultures formed after treatment with different doses of *Celtis iguanaea* Extract.

Table 2. Mean (m) and standard deviation (sd) of number of colonies (survival assessment) of *E. coli* WP2s(λ) and number of plaques (assessment of lysogenic induction) in RJF013 *E. coli* cultures formed after simultaneous treatment with different doses of *Celtis iguanaea* and MMC.

Capítulo II

Table 1. MNPCE frequencies and PCE/NCE ratio in mice bone marrow treated with *Celtis iguanaea* extract at different doses and times.

Table 2. MNPCE frequencies and PCE/NCE ratio after simultaneous treatment with *Celtis iguanaea* extract and MMC.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg: Micrograma

ABIFISA: Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico

ADP: Adenosina Difosfato

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA: Análise de Variância

APG: Angiosperm Phylogeny Group

ATP: Adenosina Trifosfato

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CUPc: Concordância de Uso Popular Corrigida

DL₅₀: Dose Letal 50%

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

ECI: Extrato de *Celtis iguanaea*

ENC: Eritrócitos Normocromáticos

EPC: Eritrócitos Policromáticos

EPCMN: Eritrócitos Policromáticos Micronucleados

FI: Fator de Indução

FS: Fração de Sobrevivência

IARC: International Agency for Research on Cancer

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ICH: International Conference on Harmonization

INCA: Instituto Nacional do Cancer

LB: Lysogeny broth

MMA: Ministério do Meio Ambiente

MMC: Mitomicina C

MMR: Mismatch repair

MN: Micronúcleo

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development

OMS: Organização Mundial de Saúde

RNA: Ácido Ribonucléico

UFG: Universidade Federal de Goiás

WWF: World Wide Fund for Nature

RESUMO

Celtis iguanaea (Jacq.) Sargent é um membro da família Cannabaceae e popularmente conhecido como “esporão de galo”. Levantamentos etnobotânicos de plantas nativas do cerrado evidenciam que o chá das folhas de *C. iguanaea* é usado popularmente para dores no corpo, asma, cólicas, má-digestão, infecções urinárias, disfunções renais, como estimulante ou como diurético. O presente trabalho teve como objetivo detectar os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e antígenotóxicos do extrato aquoso das folhas de *C. iguanaea*, pelo teste de indução do profago λ (Induteste SOS) e pelo teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos (Teste do micronúcleo). O Induteste SOS foi realizado conforme o procedimento descrito por Moreau (1976), utilizando as cepas lisogênica WP2s(λ) e indicadora RJF013, ambas derivadas de *Escherichia coli*. Culturas de WP2s(λ) foram tratadas com diferentes doses de extrato (0,5, 1, 2,5, e 5 mg) (avaliação de genotoxicidade) ou co-tratadas com uma dose única de MMC (0,5 μ g) e diferentes doses de extrato (avaliação de antígenotoxicidade). Em seguida, esta foi adicionada à cepa (RJF013) e ambas foram semeadas em placas em meio LB_(1/2). Para a avaliação de citotoxicidade, culturas de WP2s(λ) tratadas com diferentes doses do extrato foram diluídas em tampão M9 e semeadas em placas LB. O teste do micronúcleo foi realizado de acordo com a metodologia de Schmid (1975). Para a avaliação da atividade genotóxica, os animais foram tratados com o extrato de *Celtis iguanaea* (concentrações de 100, 300 e 500 mg/Kg). Para a investigação da atividade antígenotóxica, foram utilizadas as mesmas concentrações de extrato concomitantemente a 4 mg/kg de MMC. Com exceção do controle negativo (apenas 24h), todas as outras doses tiveram as frequências de eritrócidos policromáticos micronucleados (EPCMN) avaliadas em 24 e 48 horas após o tratamento. A citotoxicidade foi avaliada pela razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/ENC). Em ambos os testes os resultados obtidos mostraram atividade anticitotóxica e ausência de ação genotóxica e citotóxica do extrato das folhas de *Celtis iguanaea*. Também foi evidenciada uma atividade antígenotóxica parcial em bactérias e uma atividade antígenotóxica em camundongos.

ABSTRACT

Celtis iguanaea (Jacq.) Sargent is a member of the Cannabaceae family and popularly known as esporão de galo. Ethnobotanical surveys of cerrado native plants show that the tea leaves of *C. iguanaea* is used in traditional medicine for body aches, asthma, cramps, poor digestion, urinary infections, kidney disfunctions, as a stimulant or as a diuretic. The purpose of the present work was to evaluate the possible cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects of the leaves aqueous extract of *C. iguanaea* by the prophage λ induction test (SOS Inductest) and the micronucleous test in mice bone marrow. The SOS Inductest was performed according to Moreau (1976), using lysogenic WP2s(λ) and indicator RJF013 strains derived from *Escherichia coli*. WP2s(λ) cultures were treated with different doses of the extract (0.5, 1, 2.5, and 5 mg) (evaluation of genotoxicity) or co-treated with a single dose of MMC (0,5 μ g) and different doses of extract (assessment of antigenotoxicity). Then, the treated culture was added to the indicator strain (RJF013) and both were poured on plates in LB_(1/2) medium. For the evaluation of cytotoxicity, cultures of WP2s(λ) treated with different doses of extract were diluted in M9 buffer and plated on LB. The micronucleus test was carried out according to Schmid (1975). To assess the genotoxic activity, animals were treated with *Celtis iguanaea* extract (100, 300 and 500 mg/kg concentrations). To evaluate the antigenotoxic activity, the same doses of extract were treated simultaneously with 4mg/Kg of MMC. The frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) were evaluated at 24h and 48h exposure period except the negative control (24h). The cytotoxicity was assessed by the polychromatic and normochromatic erythrocytes ratio (PCE/NCE). In both tests the obtained results demonstrated anticytotoxic activity and absence of genotoxicity and cytotoxicity of the *Celtis iguanaea* leaves extract. The extract also showed partial antigenotoxic activity in bacteria and antigenotoxic activity in mice.

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 - Plantas Medicinais e Fitoterapia:

Plantas medicinais – Retrospectiva e Importância.

O uso de produtos de origem vegetal no tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais remotas formas de prática medicinal, e provavelmente quase tão antiga quanto a própria espécie humana (Halberstein, 2005). Fósseis datam o uso de plantas como medicamentos pelo homem em aproximadamente 60.000 anos atrás (Fabricant e Farnsworth, 2001).

A primeira documentação escrita do uso de plantas como remédios advém da China, país com a mais longa e ininterrupta tradição no uso de plantas medicinais. A obra chinesa datada de 2800 a.C., *Pen T'sao* (a grande fitoterapia) do imperador Shen Nung, possui relato de 360 espécies incluindo *Ephedra sinica*, uma planta utilizada na medicina alopata e fonte de efedrina (Eldin, 2001; Alonso, 1998).

Outro indício remoto sobre a prática da Fitoterapia é o papiro de Ebers, extraordinário documento egípcio que data de 1500 a.C. e descreve centenas de plantas medicinais. Na Grécia, Teofrasto (372-285 a.C.) discípulo de Aristóteles (384-322 a.C.), catalogou cerca de 500 espécies vegetais e Hipócrates (460-361 a.C.), considerado o pai da medicina, utilizava drogas de origem vegetal em seus pacientes, deixando uma obra (*Corpus Hippocratium*) que é considerada a mais clara e completa da Antiguidade, no que se refere à utilização de plantas medicinais (Wagner e Wisenauer, 2006; Almassy Júnior *et al.* 2005; Alonso, 1998). Na idade média, os mosteiros divulgavam o conhecimento das plantas medicinais do mundo antigo com grandes coleções e referências sobre fitoterapia. Entre elas, o livro *De viribus herbarum*, descrevia as propriedades de mais de 80 plantas medicinais (Eldin, 2001). No entanto, a inquisição levou à morte inúmeras pessoas que detinham o conhecimento sobre as plantas medicinais, considerados como bruxos e condenados à fogueira (Alonso, 1998).

O conhecimento humano dos fitomedicamentos foi enriquecido de forma empírica, através de observações e tentativas e transmitido através dos tempos. Ao longo das gerações este processo propiciou a identificação de espécies vegetais bem como das partes dos vegetais que se adequavam ao

uso medicinal, favorecendo a prevenção, o tratamento e a cura de distúrbios e disfunções do organismo (Farnsworth, 1985).

Atualmente, de acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 80% da população mundial utilizam plantas como fonte primária de diversos agentes medicinais. Além disso, dos 252 fármacos considerados como básicos e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente de origem vegetal. Sabe-se ainda que um número significativo de fármacos sintéticos foi obtido a partir de precursores naturais (Raskin *et al.*, 2002; Rates, 2001).

Calcula-se que os produtos naturais e as preparações fitoterápicas sejam responsáveis por 25% do receituário médico nos países desenvolvidos e cerca de 80% nos países em desenvolvimento. Neste sentido os produtos farmacêuticos movimentam US\$320 bilhões de dólares ao ano, dos quais US\$20 bilhões são originários de substâncias ativas derivadas de plantas (Almeida, 2003; Mitscher, 1987).

Dentre os grupos de compostos de origem natural descobertos há mais tempo e já consagrados, estão os alcalóides da papoula, constituintes do ópio, os glicosídeos cardiotônicos, e grande variedade de antibióticos (sendo os de origem vegetal, em sua maioria, compostos aromáticos, produzidos através de uma das vias biossintéticas do acetato) (Cowan, 1999; Di Stasi, 1996). Algumas substâncias químicas estão sendo testadas quanto à atividade anti-HIV, como a hipericina e os derivados acilados da castanospermina. Os derivados da artemisina, uma lactona sesquiterpênica com grupo endoperóxido, têm sido utilizados no combate da malária (Hamburger e Hostettmann, 1991). Considerando-se que a comercialização anual do taxol foi de um bilhão de dólares a partir de 1999 e a venda da vimblastina e vincristina, agentes antineoplásicos isolados de *Catharanthus roseus* G., atingem valores anuais de venda de US\$ 160 milhões, fica claro que os produtos naturais vêm cada vez mais desempenhando importante papel econômico e terapêutico na medicina moderna (Varanda, 2006).

Segundo Maciel *et al.*,(2002), uma das razões desta ampla utilização é o fato das plantas medicinais representarem muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos.

O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do mundo, com um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies, das quais apenas 55.000 estão catalogadas (Simões *et al.*, 2001).

Nosso conhecimento do uso das plantas medicinais é o resultado de uma miscigenação cultural envolvendo africanos, europeus e indígenas com introdução de espécies exóticas pelos colonizadores e escravos (Engelke, 2003). Esta tradição do uso de plantas tem sido mantida e ampliada pela medicina popular, visto que o mercado brasileiro de fitoterápicos cresce a uma taxa de 15% ao ano (Abifisa). As heranças culturais aliadas à enorme biodiversidade fazem do Brasil o país com maior potencial fitoterápico do planeta, contudo, esse potencial ainda é minimamente aproveitado.

Uma importante ação para mudar esse panorama foi o DECRETO 5.813, de 22 de junho de 2006 que determinou a criação da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Em linhas gerais seu objetivo consiste em garantir acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo uso sustentável da biodiversidade, desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.

Fitoterapia – Aplicações e Riscos

Fitoterapia é a utilização de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. Por muito tempo, atribuía-se apenas aos princípios ativos isoladamente a responsabilidade por eventual ação terapêutica. Hoje se sabe que em alguns casos um conjunto de substâncias age sinergicamente em um fitocomplexo (Williamson, 2000). Em um fitocomplexo, os compostos que não são os responsáveis-chave pela ação farmacológica podem maximizar o efeito terapêutico melhorando a estabilidade, solubilidade, biodisponibilidade e tempo de meia vida dos princípios ativos ou ainda reduzir a frequência e intensidade dos eventuais efeitos colaterais quando comparados ao composto isolado (Mills e Bone, 2000). A presença do fitocomplexo na droga vegetal também pode justificar a multiplicidade de indicações que apresentam muitas plantas medicinais (Cavallazzi *et al.*, 2003).

Entretanto, mesmo sendo o reino vegetal um enorme laboratório de síntese de recursos terapêuticos, os remédios derivados de plantas podem

também conter constituintes perigosos ou que exerçam diversos efeitos colaterais indesejáveis (Mitscher *et al.*, 1987). O mito disseminado pela cultura popular de que “o que é natural não faz mal” torna esses riscos ainda mais significativos. Estas possíveis adversidades dos fitomedicamentos, incluindo interações com outras drogas e substâncias, são muitas vezes devidas a mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas ao longo do processo evolutivo, um metabolismo secundário sintetizante de compostos tóxicos e genotóxicos contra bactérias, fungos, insetos e animais predadores (Teixeira *et al.*, 2003; Simões *et al.*, 1986).

A etnobotânica relativa às plantas medicinais é a ciência que visa identificar as espécies utilizadas por uma determinada população. Esta ciência permite avaliar o uso de plantas por comunidades humanas de forma quantitativa e qualitativa, de maneira que a coleta de dados seja precisa e completa (Martin, 1995). É necessário, portanto, uma abordagem etnobotânica e etnofarmacológica como estratégia para a investigação de plantas medicinais, que consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades que façam uso da flora local com estudos especializados (Bais *et al.*, 2006). Tais estudos devem avaliar os fitoterápicos em critérios como eficácia, qualidade e segurança (Diamond *et al.*, 2000).

No que concerne à genotoxicidade, toxicidade e carcinogenicidade são inúmeras as referências na literatura demonstrativas dessa dualidade das plantas, de um lado o potencial terapêutico e do outro os potenciais efeitos nocivos: Por exemplo, a vincristina e a vinblastina extraídos de *Catharantus roseus* são efetivos contra tumores no fígado, rins, cérebro, mama e próstata (Chechinell, 2001). Por outro lado várias substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividade citotóxica e/ou genotóxica, apresentando certa correlação com a incidência de tumores (Junior *et al.*, 2005; Ames, 1983).

Dentre outros compostos derivados de plantas que já foram identificados como mutagênicos e carcinogênicos podem ser citados safróis, hidrazinas, furocumarinas, quinonas, alcalóides de pirrolozidina e teobrominas (Khan *et al.*, 2005; Santos, 2002; Pereira, 1992; Czczot *et al.*, 1990; Garcia, 1987). Em contraposição a esses efeitos, substâncias como beta-carotenos (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), polifenóis, compostos

sulfídricos, cálcio, fibras, flavonóides, pigmentos de antraquinona, dentre outras foram identificadas com atividade antimutagênica quando em presença de um agente indutor (Hiramatsu *et al.*,2004; Lapa *et al* 2004; Chen *et al.*,2003 ; Santos, 2002; Takahashi *et al.*,2001; Ames, 1983).

Em vista desta dualidade entre riscos e benefícios dos fitomedicamentos é preocupante que o uso de plantas e produtos naturais tenha amparo legal para sua livre comercialização, resultando no seu uso indiscriminado e deixando o usuário a mercê dos riscos da auto-medicação (Konan *et al.*, 2007). Felizmente, a atenção da comunidade científica tem se voltado para a verificação das propriedades farmacológicas e/ou terapêuticas dos produtos naturais, bem como para a investigação de suas possíveis atividades toxicológicas (Rebecca *et al.*,2002).

Apesar do nosso país apresentar reconhecida biodiversidade e de nossa herança cultural quanto à utilização da flora nacional, apenas uma fração diminuta de nossas plantas nativas foram devidamente estudadas (Almeida *et al.*, 1998). Desse modo, para que a população possa exercer um uso seguro dos medicamentos fito-derivados se faz necessária uma avaliação do seu potencial genotóxico e citotóxico (Cavalcanti *et al.*, 2006).

1.2 - Cerrado

O Cerrado é a segunda maior província fitogeográfica brasileira, superado apenas pela Floresta Amazônica. Ocupa uma área de aproximadamente 2 milhões de km², ou 23% do território brasileiro (Fig.1), espalhados por 13 estados (Ratter *et al.*,1997; 2006; Ribeiro e Walter, 1998; Adámoli *et al.*, 1986).



Figura 1 - Abrangência geográfica das áreas contínuas e isoladas do Cerrado no Brasil, antes do processo de ocupação antrópica. (WWF, 1995)

O Cerrado caracteriza-se por apresentar uma vegetação peculiar com fisionomias que variam em uma ordem crescente de biomassa. Esta graduação varia desde um progressivo aumento na densidade arbórea (campo limpo, campo sujo e campo cerrado), passando pelo cerrado *strictu sensu* (com árvores baixas e esparsas) até o cerradão (com árvores altas e maior densidade). Ao longo dos rios há fisionomias florestais, conhecidas como florestas de galeria ou matas ciliares (Coutinho, 1978). De maneira geral, quanto menor a disponibilidade de água e nutrientes, e mais frequentes os incêndios, mais aberta será a vegetação do cerrado (menor será a biomassa) (Bitencourt e Mendonça, 2004). O cerrado é uma região de clima estacional (sazonalidade bem definida), com uma precipitação média anual de 1500 mm e temperaturas geralmente amenas (entre 22°C e 27°C em média) ao longo do ano (Klink e Machado, 2005; Eiten, 1972).

Geralmente, a presença do cerrado coincide com solos distróficos em 89% da região total, sendo que as condições de baixa fertilidade são

agravadas com altos teores de saturação por alumínio. Estes solos apresentam também alto grau de intemperização, processos de lixiviação bastante atuantes e baixa capacidade de troca de cátions, o que aumenta a necessidade generalizada de fósforo para as plantas, sendo este o nutriente mais deficiente (Lopes, 1985). No entanto os solos do cerrado demonstram boas propriedades físicas, como baixa densidade, alta permeabilidade, baixa resistência a penetração e boa aeração (Lopes, 1983).

Conhecido também como “berço das águas” por ser responsável pelo abastecimento das três maiores bacias hidrográficas da América latina, o cerrado possui uma malha de nascentes, córregos e rios de fundamental importância para os ecossistemas brasileiros (Oliveira Júnior e Shimabukuro, 2005).

Apesar de toda sua importância, infelizmente, o Cerrado não recebeu o status de “Patrimônio Nacional” concedido para a Mata Atlântica, Amazônia, Pantanal e Sistemas Costeiros na Constituição Brasileira de 1988. Este comportamento negligente por parte do governo e entidades ambientais aliado à crescente atividade agropecuária resultou em uma extensa conversão e fragmentação dos espaços naturais (Fig.2). De acordo com Prevedelo (2006), cerca de 80% da área original já foi alterada de alguma forma, restando apenas 20% de área natural. A ação antrópica na região agrava-se pela diferença com os esforços protecionistas governamentais nos demais ecossistemas, que possuem cerca de 12% de sua área protegida na forma de unidades de conservação, enquanto o cerrado possui menos de 2% de sua extensão protegida por lei (Kaplan *et al.*,1994). Segundo estimativas o bioma Cerrado deverá ser totalmente destruído até o ano de 2030, caso as tendências de ocupação continuem (Machado, 2004). Além disso, o fato dos cerrados ocorrerem em solos de recarga de aquíferos é mais um motivo para a preservação deste ambiente, assim como para promover a sua recuperação (Bitencourt e Mendonça, 2004).

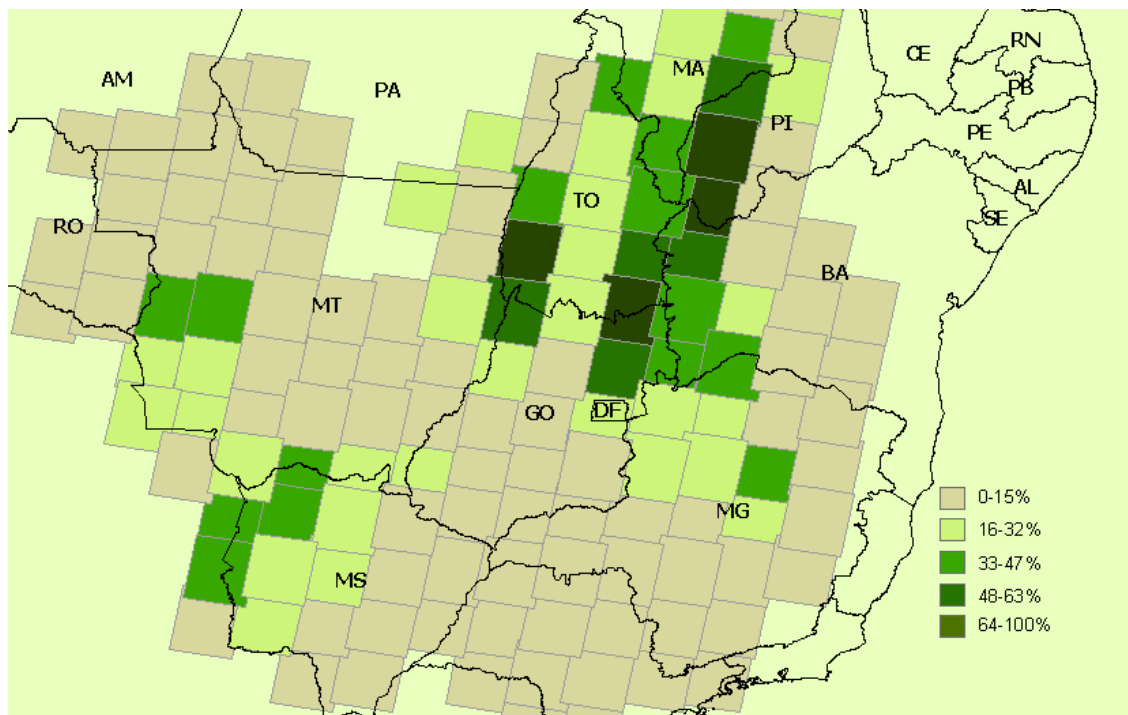


Figura 2 - Representação da estimativa de cobertura vegetal nativa do Cerrado elaborada por Mantovani e Pereira (1998). Cada quadrícula da figura significa uma cena do satélite LandSat, onde estão representadas as variações na porcentagem de cobertura.

Sendo a formação savânica mais rica do mundo, calcula-se que o Cerrado brasileiro seja responsável por cerca de 5% da biodiversidade mundial (Pires, 1999). Tal riqueza se dá especialmente quando são consideradas as espécies lenhosas (WWF e Procer, 1995). Com toda sua excepcional riqueza biológica, o Cerrado, é considerado um dos hotspots mundiais, isto é, um dos biomas mais ricos e ameaçados do Planeta (MMA, 2002; Myers *et al.*, 2000). Toda esta devastação se torna mais alarmante devido aos altos índices de espécies endêmicas no cerrado, em especial as vegetais, cujo endemismo representa 1,5% de toda a flora mundial. Segundo a compilação de informações feita por Machado (2008), o Cerrado possui um nível endêmico de plantas superiores no valor de 44% e de 70 % em relação às plantas herbáceas. Contudo, esta valiosíssima reserva de moléculas orgânicas de potencial medicinal e terapêutico ainda é infimamente explorada.

Gottlieb e Borin (1994) relataram que possivelmente há mais espécies vegetais (diversidade específica) em áreas amostrais de Floresta Amazônica

que nas de Cerrado de mesmo tamanho, salientando, porém, que a diversidade taxonômica é certamente muito maior no último. Esta diversidade é relativa aos táxons mais elevados (gênero, família e ordem), mostrando a importância do Cerrado para pesquisas com plantas medicinais. Isto porque, quanto maior for a diversidade taxonômica em níveis superiores, maior é o distanciamento filogenético entre as espécies e maior é a diferença e diversidade química entre elas. Por isso, a gama e o potencial de compostos bioativos produzidos pelas espécies do Cerrado seriam maiores que as da Floresta Amazônica. Isto se evidencia quando Kaplan *et al.* (1994) afirmaram que, utilizando-se o mesmo método de extração fitoquímica, há diferenças muito contrastantes, visto que as espécies de Floresta Amazônica apresentam pequeno número de compostos em grandes quantidades e as de Cerrado, grande número de compostos estreitamente relacionados, mas em quantidades menores. Por essas características, o bioma Cerrado deveria ser considerado área prioritária de pesquisas com plantas medicinais e conservação de recursos naturais (Guarim Neto e De Moraes, 2003).

1.3 - *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent

Celtis iguanaea (Jacq.) Sargent é uma angiosperma membro da ordem Rosales também conhecida como “esporão de galo” (Souza *et al.*, 2005). O nome desta espécie se origina do fato de que seus frutos são comidos por iguanas (Berg e Dahlberg, 2001). A taxonomia de *Celtis* tem sido controversa a muito tempo, sendo este gênero inicialmente incluído na família Ulmaceae, subfamília Celtidaceae (Sattarian, 2006). Contudo, recentes estudos filogenéticos moleculares situaram o gênero *Celtis* como integrante da família Cannabaceae (APG, 2003).

Celtis é um gênero largamente difundido, sendo encontrado em todas as áreas tropicais, e em muitas regiões temperadas do mundo. Apresenta distribuição natural na África, na região do Mediterrâneo, Ásia, Américas (Norte, Central e Sul) e no norte da Austrália (Sattarian, 2006) (Fig.3). *Celtis iguanaea* por sua vez encontra-se dispersa por toda a América, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina, em vários tipos de vegetação (de úmida a mais ou menos seca). A espécie é bastante variável, principalmente em relação

às características da lâmina foliar (margem, tamanho e indumento). As diferentes formas encontradas ao longo de sua distribuição faz com que *Celtis iguanaea* tenha vasta sinonímia botânica, *Celtis aculeata* Sw.; *Celtis goudotii* Planch.; *Celtis glycyarpa* Mart. ex Miq.; *Celtis spinosa* Spreng.; *Celtis hilariana* Planch.; *Celtis triflora* (Klotzsch) Miq.; *Celtis williamsii* Rusby; *Mertensia laevigata* Kunth in H.B.K.; *Celtis diffusa* Planch.; dentre muitas outras (Berg e Dahlberg, 2001).

Celtis iguanaea (Fig.4) é uma planta arbustiva ou arbórea de pequeno porte, de até 10 m de altura, com espinhos majoritariamente solitários, por vezes emparelhados e geralmente recurvos. Apresenta tronco tortuoso, forte e flexível, ramos acastanhados e compridos, e lenticelas numerosas e conspícuas. Possui folhas ovado-oblongas ou subovadas, de dimensões variando entre (2-15) x (1-8,5) cm. As inflorescências são ramificadas e amarelo-esverdeadas, bissexuais ou estaminadas, sendo de 1 a 3 flores por inflorescência; com ovário ovóide a obovóide e estigmas ramificados. Seus frutos possuem forma ovóide ou globosa, com 1,2-1,7 cm de comprimento quando secos, apresentando coloração de amarelo pálido a laranja quando maduros. (Pilati e Souza, 2006; Souza *et al.*, 2005; Berg e Dahlberg, 2001).

A etnobotânica e a etnofarmacologia têm enorme importância no estudo de plantas medicinais, por evitar a ineficiência do mecanismo de tentativa e erro, combinando informações empíricas adquiridas junto às comunidades locais com ensaios que comprovem e justifiquem seu uso (Elisabetsky e Souza, 2004). A concordância de uso popular corrigida (CUPc) é uma medida que aponta os usos mais difundidos e aceitos para uma espécie, pois, provavelmente, são utilizados e reconhecidos por muitas pessoas. De modo geral, quanto maior o consenso do uso popular de determinada espécie para um fim medicinal, mais se evidencia a segurança quanto à sua validade (Vendruscolo & Mentz 2006).

Segundo o levantamento sobre o uso de recursos medicinais no município de Ouro Verde - GO realizado por Silva e Proença (2008), *Celtis iguanaea* foi uma das duas espécies medicinais nativas do bioma Cerrado a apresentar uma CUPc com valores acima de 50%, sendo obtido o valor de 54%. De acordo com as autoras, as espécies com CUPc maior que 50% apresentam um apreciável consenso de uso popular, o que pode indicar

potencial medicinal e funcionar como uma pré-triagem para estudos etnofarmacológicos.

O chá ou infusão das folhas de *Celtis iguanaea* (esporão-de-galo) é usado na medicina popular para dores no corpo, asma, cólicas, má-digestão, infecções urinárias, disfunções renais, como estimulante ou como diurético (Carneiro, 2009; Silva e Proença, 2008; Piliackas *et. al.*, 2001). No entanto, ainda que exista um considerável consenso popular em relação às propriedades medicinais do “esporão de galo”, muito pouco se sabe sobre os efeitos biológicos de seus constituintes, pois a planta até o momento apresenta uma literatura bastante escassa, principalmente em se tratando de suas potenciais propriedades toxicológicas. Desse modo, devido à conhecida utilização de *Celtis iguanaea* pela população se tornam necessários ensaios que avaliem seus efeitos farmacológicos, assim como suas possíveis atividades genotóxica, antigenotóxica e citotóxica.



Figura 3 – Distribuição Natural do gênero *Celtis* no mundo (Sattarian, 2006).



Figura 4 - *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (Esporão de galo).; A - Árvore; B - Ramo; C - Espinho; D - Folhas; E - Flores; F – Fruto (Flora Digital RS - Endereço Eletrônico).

1.4 - Genética toxicológica

Mutação, Genotoxicidade e Carcinogênese

A correta duplicação do genoma, seguida da segregação dos cromossomos livres de danos para as células filhas é crucial para a saúde e longevidade de todos os organismos. A fidelidade destes processos é assegurada por várias respostas celulares aos danos genéticos, como

paralisação do ciclo celular, indução de mecanismos de reparo e apoptose (Levitt *et al.*, 2007). Ainda assim, o DNA de um organismo não é uma molécula estática, freqüentemente suas bases estão expostas a agentes naturais ou artificiais que provocam modificações na sua estrutura ou composição química (Zaha, 2000).

Esta vulnerabilidade do material genético às agressões impostas pelo ambiente criou uma nova área de pesquisa, a Genética Toxicológica, setor da genética que estuda os processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura físico-química, o DNA (ácido desoxirribonucléico), processo este classificado de mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético ao nível celular ou orgânico, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese (Erdtmann, 2003). Trata-se de uma área interdisciplinar onde especialistas em genética, bioquímica, biologia molecular, imunologia, farmacologia e toxicologia trabalham juntos para estudar as lesões induzidas ao genoma por agentes físicos, químicos e biológicos (Brown, 1999 ; Ribeiro e Marques, 2003).

Assim, a função primária dos testes de toxicologia genética é investigar, usando células ou organismos, o potencial de genotoxinas induzirem mutações e lesões ao DNA em células somáticas ou germinativas (Da Silva *et al.*, 2003). Tais estudos representam um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos (Kiskinis *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*, 2001; Gollapudi e Krishna, 2000), devendo ser realizados nos estágios iniciais desse desenvolvimento a fim de prognosticar uma potencial atividade nociva (Snyder e Green, 2001; Gollapudi e Krishna, 2000).

Genotoxicidade é um termo amplo que se refere às alterações na estrutura geral e/ou na disposição dos cromossomos, ou nas sequências de pares de bases do DNA (mutagenicidade) por exposição a agentes tóxicos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). Desta forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (Combes, 1992).

Por sua vez, o termo mutação refere-se a qualquer mudança súbita e herdável no genótipo de um organismo (Simmons e Snustad, 2001). Em geral estas mudanças levam à expressão de proteínas estruturais ou enzimas com funções alteradas, podendo ser deletérias e até deletérias para o indivíduo.

Entretanto, podem também contribuir para a construção de novas informações genéticas e são consideradas a principal fonte de variabilidade. As mutações ocorrem naturalmente (espontâneas), ou em resposta de exposição a agentes mutagênicos (induzidas) (Sarasin, 2003; Rouse e Jackson, 2002).

Conforme Takahashi (2003), existem três níveis de mutações: as mutações gênicas, as aberrações cromossômicas estruturais e as aberrações cromossômicas numéricas.

Uma gama enorme de agentes mutagênicos já foram descritos, dentre eles estão os agentes físicos como as radiações ionizantes, biológicos como as infecções por vírus e os químicos, como os conservantes alimentares (Wogan, 2004).

É importante salientar que o mesmo agente mutagênico pode produzir comportamento mutagênico distinto em organismos também distintos (Gatehouse, 1990). Isso ocorre devido a uma série de fatores, como ativação metabólica (pró-mutágenos), processo de detoxificação de compostos químicos, variedade de sistemas de reparo e efeito do mutágeno na fisiologia celular (Klaassen e Watkins, 1999; Farah, 1997). Os agentes mutagênicos podem induzir mudanças genômicas por interagir diretamente ou indiretamente com o DNA ou por interagir com proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma (Houtgraaff *et al.*, 2006; Kirsch-Volders *et al.*, 2003). Alguns mutágenos por sua vez podem exercer mais de um mecanismo de ação, como por exemplo a radiação ionizante. Ela age diretamente no DNA acarretando quebras de fita simples e duplas, e indiretamente através da interação de fótons com moléculas de água levando à hidrólise e produção de radicais livres com subsequente ataque ao DNA e proteínas (Dowd e Tilson, 1999; Nias, 1998).

A toxicidade genética não é uma medida direta de carcinogenicidade, mas é frequentemente usada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (Fearon e Vogelstein, 1990). Esta relação entre mutações e neoplasias é bem documentada, sendo que compostos químicos reconhecidamente cancerígenos são, em sua maioria, positivos quando testados em ensaios que medem mutagenicidade, enquanto que drogas

reconhecidamente não cancerígenas em geral não são mutagênicas (Ames e Gold, 2000; 1989; Lijinsky, 1989; Maron e Ames, 1983).

Segundo De Flora (1996; 1998), há também evidências do papel das mutações na patogenia de doenças crônico-degenerativas, principais causas de mortalidade na população humana. Quando tais mutações ocorrem nas células germinativas, elas podem originar alterações genéticas transmissíveis, levando a desordens genéticas, fertilidade reduzida, síndromes fetais, malformações e até abortos (Rabello-Gay, 1991).

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de manifestações clínicas patológicas, caracterizadas pela perda do controle do crescimento celular e o ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (Pinto e Felzenszwalb, 2003).

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) / OMS (World Cancer Report, 2008), o impacto global do câncer duplicou nos últimos 30 anos. No ano de 2008, ocorreram mais de 12 milhões de casos novos de câncer e mais de 7 milhões de óbitos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, têm afetado de forma significativa o impacto do câncer no mundo. No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para taxas alarmantes de novos casos de câncer (INCA, 2009) (Fig.5).

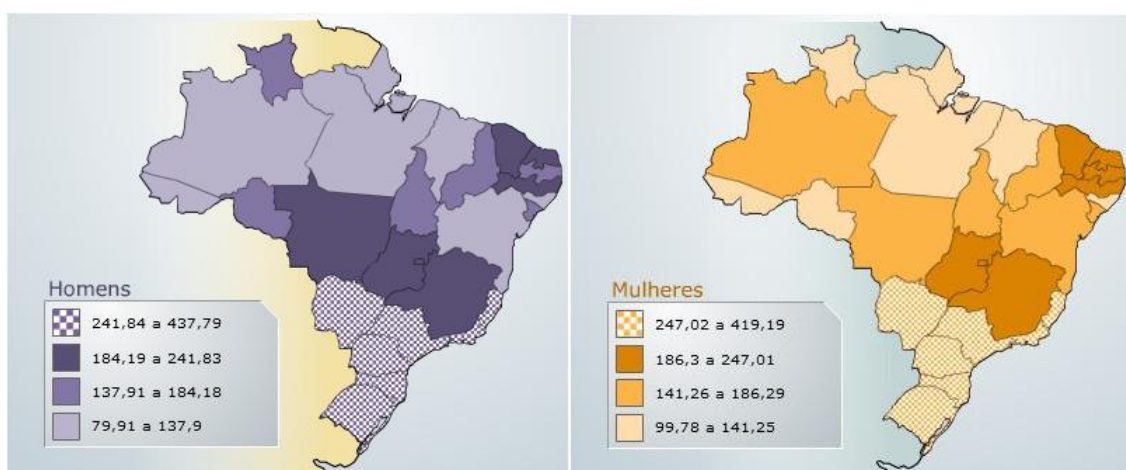


Figura 5 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 homens e mulheres estimadas para o ano 2010, segundo a Unidade da Federação - todas as Neoplasias (INCA, 2009).

O desenvolvimento de cânceres é relacionado a mutações em diversos tipos de genes, dentre eles podemos citar: (1) mutações que promovem o crescimento celular pela ativação de oncogenes; (2) mutações que diminuem a supressão do crescimento celular pela inativação dos genes supressores tumorais; (3) mutações que resultam na deficiência ou inativação dos genes do sistema de reparo do DNA, acumulando danos no DNA e levando à instabilidade genética da célula, (4) alterações nos genes controladores do ciclo celular (checkpoints) e genes relacionados à apoptose (Breivik, 2005; Pierce, 2004). As principais lesões encontradas nesses genes são mutações dos tipos substituição de bases e deslocamento do quadro de leitura (frameshift) do DNA, numa grande variedade de tipos de câncer (Greenblatt *et al.*, 1994).

O desenvolvimento de neoplasias está também relacionado a eventos epigenéticos, que são alterações reversíveis e herdáveis no genoma funcional (expressão gênica) sem mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA. Tais eventos desempenham papel importante na formação de tumores, visto que alterações no epigenoma ocorrem em diversos estágios da carcinogênese, incluindo o silenciamento de genes supressores de tumor (Ting *et al.*, 2006; Kopelovich *et al.*, 2003). Atualmente, são conhecidos três mecanismos principais de alterações epigenéticas: metilação do DNA, modificações de histonas e ação de RNAs não codificadores (Davis e Brackmann, 2003; Chen e Pikaard, 1997). As mudanças epigenéticas são fortemente influenciadas pelo ambiente, de modo que qualquer alteração ambiental (ataque de patógenos, tipo de alimentação e hábitos) pode resultar em alterações relevantes no epigenoma (Ting *et al.*, 2006). Além disso, a epigenética está intimamente relacionada com o aumento na variabilidade fenotípica dos indivíduos, tendo assim significativa importância para a evolução.

O processo de carcinogênese é altamente complexo e envolve múltiplas etapas. Inúmeros xenobióticos, assim como outros fatores ambientais, podem interferir positiva ou negativamente em cada um dos passos que levam ao desenvolvimento final da neoplasia. Além disso, os diferentes fatores ambientais podem interagir, aumentando ou diminuindo o efeito de cada um deles quando considerado isoladamente. À luz do conhecimento atual, o

desenvolvimento do câncer pode ser visto esquematicamente como um processo sequencial de múltiplas etapas, tal como ilustrado na figura 6.

Principais etapas da carcinogênese induzida por agentes químicos genotóxicos. O processo de carcinogênese como um todo pode ser visto como uma seqüência de alterações em que as células somáticas progressivamente escapam dos mecanismos que, em condições normais, controlam a sua proliferação. Várias substâncias podem modular a iniciação atenuando-a (e.g. antimutagênese) ou exacerbando-a (e.g. co-carcinogênese), e algumas substâncias "não genotóxicas" (carcinógenos epigenéticos), embora incapazes de iniciar a carcinogênese podem facilitá-la atuando na promoção e progressão (e.g. induzindo a proliferação celular).

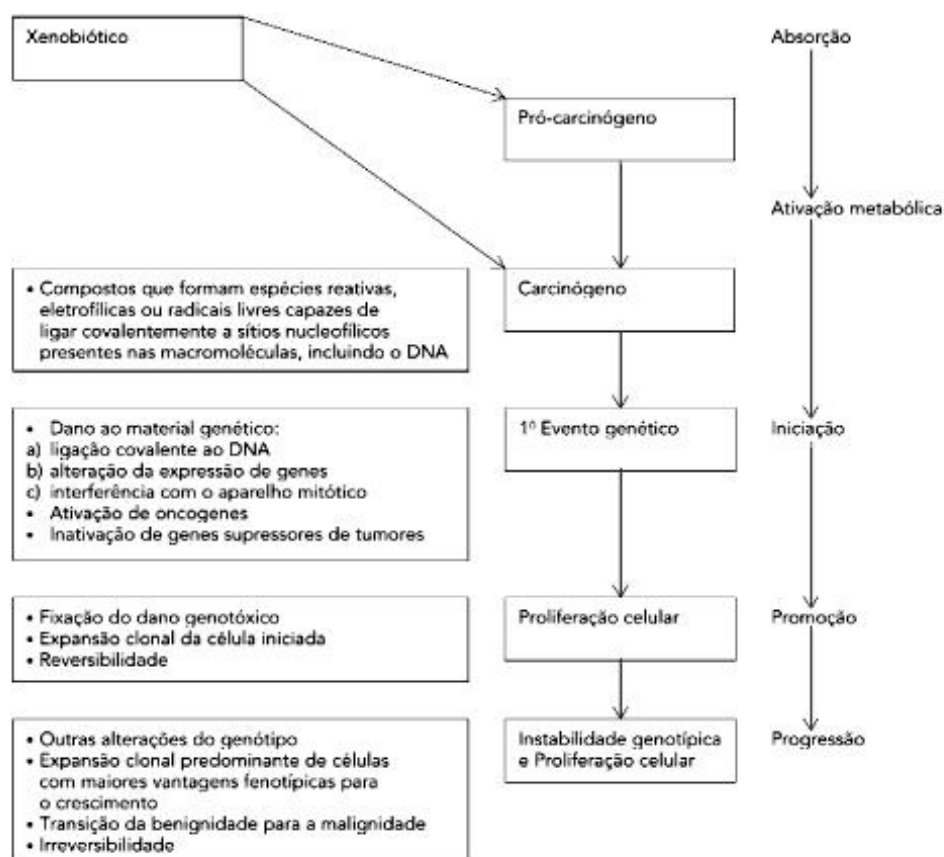


Figura 6 - Principais etapas da carcinogênese induzida por agentes químicos genotóxicos (Gomes-Carneiro, 1997).

A carcinogênese pode ser vista como consistindo de três seqüências distintas: a iniciação, a promoção e a progressão. A conversão neoplásica (iniciação) ocorre quando um evento genético (mutações, rearranjos cromossômicos, inserções ou deleções de genes e amplificação de genes) resulta em ativação de oncogenes e/ou em falta de expressão – ou inativação de produtos – de genes supressores de tumores (Gomes-Carneiro, 1997).

Na promoção as células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é

transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo nesse estágio (Almeida, 2005).

O terceiro e último estágio (progressão) caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (Almeida, 2005).

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções; por exemplo, a invasão neoplásica dos pulmões gera alterações respiratórias; com isto há a disfunção orgânica que pode levar à falência do órgão ou, em casos mais graves, leva à morte do paciente (Almeida, 2005).

Atualmente, existem quatro principais tipos de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia, quimioterapia e a terapia biológica. Recentemente, também tem sido utilizada a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfíricos e a imunoterapia, sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, nos quais são associadas várias estratégias de tratamento (Almeida *et al.*, 2005).

No entanto, a maneira mais eficaz, barata e segura de se evitar o processo de carcinogênese ainda é a medida profilática, abrangendo desde mudanças em hábitos pessoais como alcoolismo e tabagismo até a dieta, sendo esta um fator de suma importância na prevenção do câncer. Segundo Antunes e Araujo (2000), a ingestão de alimentos é uma das principais vias de exposição do homem a diferentes compostos, visto que uma mistura complexa de agentes químicos é encontrada na dieta. Algumas das substâncias presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, isto é, podem induzir mutações no DNA favorecendo o desenvolvimento de tumores, enquanto outras podem atenuar ou anular estes efeitos. Acredita-se que cerca de um terço de todos os cânceres humanos possam estar relacionados com o hábito alimentar (Renner, 1990; Ames, 1983).

Neste contexto, a comprovação científica da origem mutacional de vários tipos de câncer oriundos do efeito genotóxico de substâncias químicas, físicas e biológicas levaram à necessidade de se desenvolver testes que permitiam avaliar o potencial nocivo de tais substâncias (Natarajan, 2002; Ames, 1989). Atualmente, dispõem-se de dezenas de ensaios para a detecção da genotoxicidade, tais testes empregam diferentes modelos como fagos, bactérias, algas, fungos, leveduras, insetos, células de mamíferos e roedores *in vivo* (Melo, 2009). Deste modo, os testes de genética toxicológica baseiam-se na capacidade de se avaliar a mutagenicidade de um agente, de acordo com o aumento da frequência de mutações induzidas em relação à frequência de mutações em nível basal (Westman, 2006).

Historicamente, vários manuais de testes de toxicidade genética têm sido elaborados em muitos países, definindo a bateria de testes recomendados, procedimentos detalhados, bases científicas, justificativas para a seleção do teste e orientações para a interpretação dos resultados (Choy, 2001). Tais manuais são determinados normalmente pelas diretrizes regulatórias internacionais: International Conference on Harmonization (ICH), e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), no Brasil ficando sobre a responsabilidade regulatória da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A bateria padrão em testes de genética toxicológica recomendada pela International Conference on Harmonization (ICH, 1997) consiste dos seguintes ensaios: (1) um teste de mutação gênica em bactéria; (2) um teste *in vitro* com avaliação citogenética de danos cromossômicos com células de mamíferos ou um ensaio linfoma tk[±] de camundongo *in vitro* e; (3) um teste *in vivo* para danos cromossômicos utilizando células hematopoiéticas em roedores (ICH, 1997).

No Brasil, vários estudos são realizados para comprovar a ação farmacológica de plantas, porém, ainda são poucos os esforços no sentido da avaliação da genotoxicidade, sendo grande a preocupação no que diz respeito à segurança no uso de extratos vegetais. Com a intenção de garantir a qualidade e segurança da fitomedicina, a ANVISA atualmente estabelece que os fitofármacos devem ser submetidos a ensaios toxicológicos pré-clínicos e clínicos. Assim, ensaios com as diversas plantas utilizadas pela população são

de grande importância, estabelecendo medidas de controle no seu uso indiscriminado (Fonseca e Pereira, 2004).

Reparo, Antigenotoxicidade e Quimioprevenção

Apesar das mutações genéticas serem de extrema importância para a evolução de uma espécie, a sobrevivência do indivíduo depende da estabilidade do seu genoma. Tal estabilidade é constantemente abalada por alterações químicas diversas resultantes de três causas principais: espontâneas, por produtos do metabolismo celular e ambientais (Ferreira e Rocha, 2004).

O genoma de uma célula de mamífero típica acumula muitos milhares de lesões durante um período de 24 horas. Entretanto, graças ao reparo de DNA, menos de uma em mil torna-se uma mutação. O DNA é uma molécula relativamente estável, mas na ausência dos sistemas de proteção, o efeito cumulativo de muitas reações não frequentes, mas lesivas, tornaria a vida impossível. (Lehninger, 2006).

A complexa rede de sistemas de reparo do DNA envolve vários mecanismos enzimáticos, que revertem as lesões produzidas pelos variados tipos de agentes genotóxicos e por alterações normais que ocorram na própria célula, como erros na replicação do DNA, onde bases são alteradas ou perdidas, quebras em ligações fosfodiéster da cadeia e ligações covalentes cruzadas nas fitas. Esses mecanismos de reparo podem atuar por uma série de métodos, como por exemplo: fotorreativação enzimática, restauração de bases alquiladas, excisão de bases ou nucleotídeos, enzimas de correção de erros, recombinação pós-replicação e SOS (Griffiths *et al.*, 2002; Schrank *et al.*, 2001).

Também fazem parte do sistema de reparo uma série de respostas celulares aos danos causados, como a ativação de vias que inclui a senescência celular (parada do ciclo celular), ativação transcricional e pós-transcricional de uma série de genes e, em algumas circunstâncias, a ativação do processo de apoptose (morte celular programada) (Ferreira e Rocha, 2004; Goode, *et al.*, 2002; Khanna e Jackson, 2001). Enfim, o aparato de proteção ao DNA envolve diversos sistemas enzimáticos, especializados em desmutar,

neutralizar e detoxificar diversos íons e moléculas para formas menos tóxicas, a fim de que possam ser eliminadas da célula e do sistema como um todo (Louro *et al.*, 2002).

Deficiências nos mecanismos de reparo de DNA podem resultar no aumento da taxa de desenvolvimento de câncer. Por exemplo, deficiências nos genes das proteínas do sistema MMR (Mismatch repair), as quais zelam pela estabilidade do DNA durante a replicação, podem levar ao acúmulo de mutações no genoma, dentre elas as que modificam os genes que regulam o ciclo celular (p53, p21, p27, p16, Rb, etc), podendo levar à carcinogênese (Pinto e Felzenszwalb, 2003). Aparentemente, falhas nos processos de sinalização de danos no DNA e nas vias de reparo dos mesmos são fundamentais para a etiologia da maioria, se não de todos, os cânceres humanos (Goode *et al.*, 2002; Khanna e Jackson, 2001).

Tendo em vista que os agentes mutagênicos estão direta ou indiretamente ligados à carcinogênese, a possibilidade de controle ou mesmo atenuação da resposta celular contra os mesmos, seja diretamente ou por auxílio ao sistema de reparo, tem aberto novas fronteiras para o estudo da prevenção e controle do câncer e outras doenças degenerativas (Trichopoulos *et al.*, 1995). Tem se observado uma crescente tendência de investigações na área de antigenotoxicidade e anticarcinogenicidade de diversos produtos químicos naturais (Liviero e Von Borstel, 1996; Mitscher *et al.*, 1996; De Flora *et al.*, 1992; Kuroda *et al.*, 1992). Ao longo das duas últimas décadas aproximadamente 25.000 artigos foram publicados na área de antimutagênese e anticarcinogênese, sendo que mais de 80% dos agentes estudados eram de origem vegetal e utilizados na dieta ou com propósitos medicinais (Knasmuller *et al.*, 2002).

O termo antimutagênico foi originalmente usado para descrever aqueles agentes capazes de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independente do mecanismo envolvido (Waters *et al.*, 1990).

Aaron Novick e Leo Szilard, em 1952, foram os primeiros a relatarem a respeito deste processo, eles observaram que um aumento na quantidade de adenosina podia diminuir as mutações induzidas pela cafeína em bactérias (Liviero e Von Borstel, 1996).

Os agentes antimutagênicos foram classificados em dois grupos de acordo com seu mecanismo de ação (Kada e Shimoï 1987; Kada *et al.*, 1982). Agentes desmutagênicos são capazes de inativar um agente mutagênico antes que ele atue sobre o DNA, pela atuação direta do composto no agente lesivo, ou em seus precursores, inativando-os química ou enzimaticamente (De Flora, 1998; Fergusson, 1994; Hartman e Shankel, 1990; Kada e Shimoï, 1987). As substâncias bioantimutagênicas atuam como moduladoras do reparo e replicação do DNA. Agem em nível celular aumentando a fidelidade na replicação, estimulando o reparo livre de erro ou ainda inibindo os sistemas de reparo sujeitos a erro (De Flora, 1998; Simic *et al.*, 1998; Hartman e Shankel, 1990).

Contudo, é interessante apontar que os agentes antimutagênicos geralmente não exercem seus efeitos protetores por meio de um único mecanismo de ação (Gebhart, 1992). A vitamina C, por exemplo, pode agir como um agente desmutagênico ou bio-antimutagênico, por meio da modulação do metabolismo celular ou pelo bloqueio da atividade das moléculas reativas (Antunes e Takahashi, 1998).

De acordo com Balunas e Kinghorn (2005), quimioprevenção consiste na suplementação da dieta com alimentos, medicamentos e compostos naturais para reverter ou suprimir o processo de formação do câncer. A quimioprevenção é uma estratégia que almeja prevenir e/ou interromper cada uma das etapas da carcinogênese: A estratégia anti-iniciação consiste em inibir alterações e induzir reparos na molécula de DNA. A detoxificação, como por exemplo, o sequestro de radicais livres e de metabólitos carcinogênicos, atua principalmente na etapa de anti-promoção. Na anti-progressão a estratégia é suprimir a proliferação, aumentar a imunidade, reduzir o processo inflamatório e aumentar a apoptose (Balunas e Kinghorn, 2005; De Flora e Ferguson, 2005).

Maluf e Erdtmann (2003) afirmam que o uso de antimutagênicos e anticarcinogênicos na vida cotidiana é um dos procedimentos mais eficazes para prevenir o câncer e doenças genéticas humanas. O aumento do consumo de alimentos e medicamentos contendo componentes quimiopreventivos (grande parte produtos naturais oriundos de vegetais) evidencia o crescente interesse da população sobre os possíveis efeitos antimutagênicos de diversos

compostos (Lehmann *et al.*, 2000). Neste contexto, tem se aumentado também a necessidade de testes de identificação de substâncias com tais propriedades.

Segundo Gebhart (1992), as metodologias citogenéticas clássicas para avaliar a mutagenicidade de agentes químicos e físicos também podem ser empregadas para avaliação e identificação de agentes antimutagênicos. Assim, ensaios com células de microorganismos ou de mamíferos têm sido amplamente utilizados tanto nos estudos de mutagenicidade como nos de antimutagenicidade.

O potencial quimiopreventivo de uma substância é testado confrontando o suposto antimutágeno com uma substância sabidamente mutagênica, e então se deve observar a redução (ou não) das lesões produzidas no DNA quando comparadas com o composto indutor isoladamente (Luiz, 2002). Nestes ensaios, diversos agentes reconhecidamente indutores de danos ao DNA têm sido utilizados, dentre eles está o quimioterápico Mitomicina C (MMC) (De Flora *et al.*, 1992; Kuroda *et al.*, 1992).

A mitomicina C é um composto antibiótico aminoglicosídeo com atividade antineoplásica. Foi primeiramente isolada de uma cultura de *Streptomyces caespitosus* (Wakaki *et al.*, 1958; Hata e Sugawara, 1956), e desde 1983 vem sendo usada em humanos (Estrem e Vanleeuwen, 2000). Apresenta-se como um cristal azul-violeta com peso molecular de 334 daltons, solúvel em água e em fluidos orgânicos. Sua molécula (Fig.7) possui três grupos carcinostáticos conhecidos: um anel de aziridina, um grupo quinona e um grupo octano (Ribeiro *et al.*, 2003).

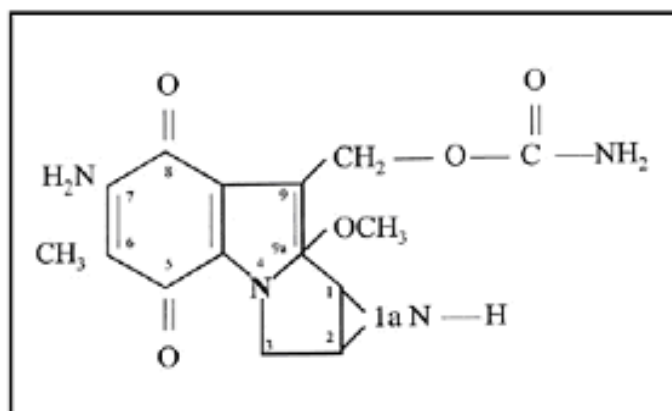


Figura 7 - Molécula da MMC (Ribeiro *et al.*, 2003).

Pelo menos dois processos distintos são responsáveis pelos efeitos biológicos exibidos pelas mitomicinas: alquilação do DNA e geração de radicais livres como o superóxido e radicais hidroxil, induzindo, desse modo, quebra na fita de DNA (Kang *et al.*, 2006). A MMC atua principalmente inibindo a síntese de DNA por ligação cruzada (DNA cross-linking) entre adenina e guanina (D'eredittá, 2004; Gray *et al.*, 2003), sendo que em concentrações mais elevadas a síntese de ácido ribonucléico (RNA) e de proteínas também é suprimida (O'Reilly *et al.*, 2001). Assim, por ter características bem conhecidas e seus principais mecanismos de ação elucidados, a MMC foi o composto escolhido como controle no presente trabalho, sendo utilizada tanto para os ensaios bacterianos (Induteste SOS) como em Camundongos (Teste do micronúcleo).

1.5 – Induteste SOS - Teste de indução lisogênica em cepas de *Escherichia coli*

As bactérias apresentam um crescimento acelerado e em meio relativamente simples, o que faz destes microorganismos modelos bastante atrativos para ensaios de genotoxicidade, por proporcionarem resultados rápidos e de baixo custo. Desde 1975, muitos testes bacterianos de 'curto prazo' têm sido propostos (Montesano *et al.*, 1987).

O teste bacteriano utilizado neste trabalho foi baseado no princípio da indução de uma das funções de reparo do DNA conhecido por reparo do tipo SOS. Em 1975 Miroslav Radman concluiu que em *E. coli* havia um sistema de reparo dependente das proteínas LexA e RecA que era induzido quando o DNA era severamente danificado e sua síntese paralisada. Radman nomeou este mecanismo de reparo ou resposta "SOS" em analogia ao sinal de socorro internacional no alfabeto Morse.

A resposta SOS é hoje a mais estudada resposta transcricional ao dano no DNA (Walker, 1996; Friedberg *et al.*, 1995), e consiste basicamente na regulação dos genes SOS-induzidos pelas proteínas LexA e RecA, sendo LexA uma proteína repressora transcricional, e RecA uma coprotease que auxilia a autoclivagem de LexA (Walker, 1984; Horii *et al.*, 1981) (Fig. 8).

The SOS response

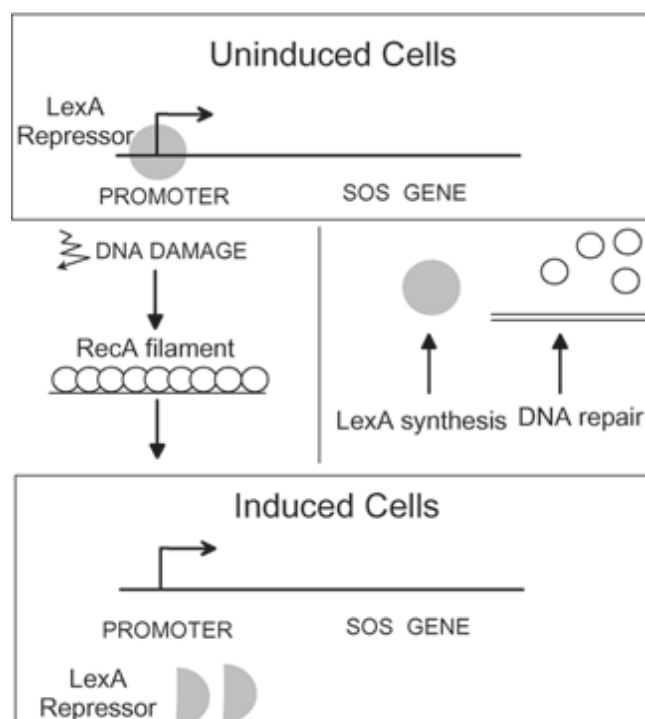


Figura 8 - O comportamento oscilatório da resposta SOS. Em condições de crescimento não-induzidas, o repressor LexA liga-se a promotores SOS-controlados, limitando ou impedindo sua ação. Mediante danos ao DNA, filamentos de RecA são formados e ativam a autoclivagem do repressor LexA, permitindo a expressão dos genes SOS. A indução SOS é revertida quando os danos são reparados. Isto é devido ao desaparecimento do filamento RecA e permite que moléculas LexA recém-sintetizadas vinculem-se aos promotores SOS (Michel, 2005).

A produção de DNA de fita simples (ssDNA) por vários agentes indutores e o desencadeamento dos mecanismos de reparo são vinculados pela proteína RecA. A proteína RecA tem uma grande afinidade para formar filamentos nucleoprotéicos no ssDNA, e uma menor afinidade com o DNA de fita dupla (dsDNA) (Schlacher *et al.*, 2006; Arenson *et al.*, 1999). Este fato provavelmente protege contra a destruição do DNA, e é essencial para todos os aspectos da atividade de RecA. A ligação de RecA ao ssDNA progride na direção 5'-3' na proporção de 1 molécula de RecA por 3 bases, e requer ATP, mas nenhuma atividade ATP-ase. O desligamento, em contrapartida, exige hidrólise de ATP a ADP e ocorre muito mais lentamente (Janion, 2008). A

proteína RecA ligada a ssDNA se converte em sua forma ativada (RecA*) e adquire uma atividade coproteásica. RecA* interage com LexA, o repressor dos genes SOS (Wagner *et al.*, 1999). Essa interação provoca a clivagem autocatalítica de LexA e consequente destruição da sua capacidade de funcionar como um repressor, o que resulta na expressão dos genes SOS (Fernandez *et al.*, 2000; Mustard e Little, 2000).

Cada um dos genes SOS tem próximo ao seu sítio promotor uma sequência específica de 20 nucleotídeos, denominada "Sítio-SOS" onde a proteína repressora LexA está vinculada, impedindo a ligação da RNA polimerase e expressão gênica (Lewis *et al.*, 1994; Walker, 1984). O sítio-SOS tem uma estrutura palíndromica, sugerindo que o repressor LexA se liga como um dímero, como foi confirmado posteriormente (Thliveris *et al.*, 1991).

Usando técnicas de microarranjos de DNA, Courcelle e colaboradores (2001) mostraram que em *E. coli* a expressão de 43 genes é controlada por LexA. Estes genes codificam proteínas envolvidas em uma série de respostas celulares, como mutagênese (umuDC), reparo de excisão de nucleotídeos (uvrA e uvrB), recombinação genética (recA, recN, recQ e recD) e filamentação celular (sulA e sulB) (Friedberg *et al.*, 1995).

A resposta SOS tem sido encontrada em muitas outras espécies de bactérias (por exemplo, *Salmonella typhimurium*, *Caulobacter crescentus* e *Mycobacterium tuberculosis*), mas não nas células eucarióticas. No entanto, as espécies de todos os reinos contêm algumas proteínas SOS-análogas, que participam na reparação do DNA e apresentam homologia de aminoácidos e atividades enzimáticas relacionadas com as encontradas em *E. coli*, porém não são organizadas em um sistema SOS (Eller *et al.*, 2008; Janion, 2008).

A capacidade de mensurar a amplitude de expressão das funções SOS pelos agentes genotóxicos constitui uma poderosa ferramenta, e permite indicar a ocorrência de danos no DNA, ou seja, a atividade genotóxica ou potencialmente oncogênica de um determinado agente físico ou químico.

O Induteste-SOS foi desenvolvido por Patrice Moreau e colaboradores em 1976, no laboratório de Enzimologia em Gif-sur-Yvette, França. Ele foi baseado no princípio da indução lisogênica, fenômeno que serve como um indicador da produção de lesões no DNA e da inibição da replicação semi-conservativa. Este ensaio fundamenta-se na avaliação quantitativa de uma das

funções SOS, que é a autoclivagem da proteína CI, repressora do profago lambda (λ), mediada pela coprotease RecA (Little, 1991).

Indução lisogênica é a propriedade que certos fagos possuem de se manterem normalmente em estado de latência em bactérias lisogênicas (profagos), podendo eventualmente ser induzidos a se desenvolver de maneira autônoma, quando o DNA das células que os abrigam é lesado ou a sua replicação é bloqueada (Moreau *et al.*, 1981; 1976) (Fig.9).

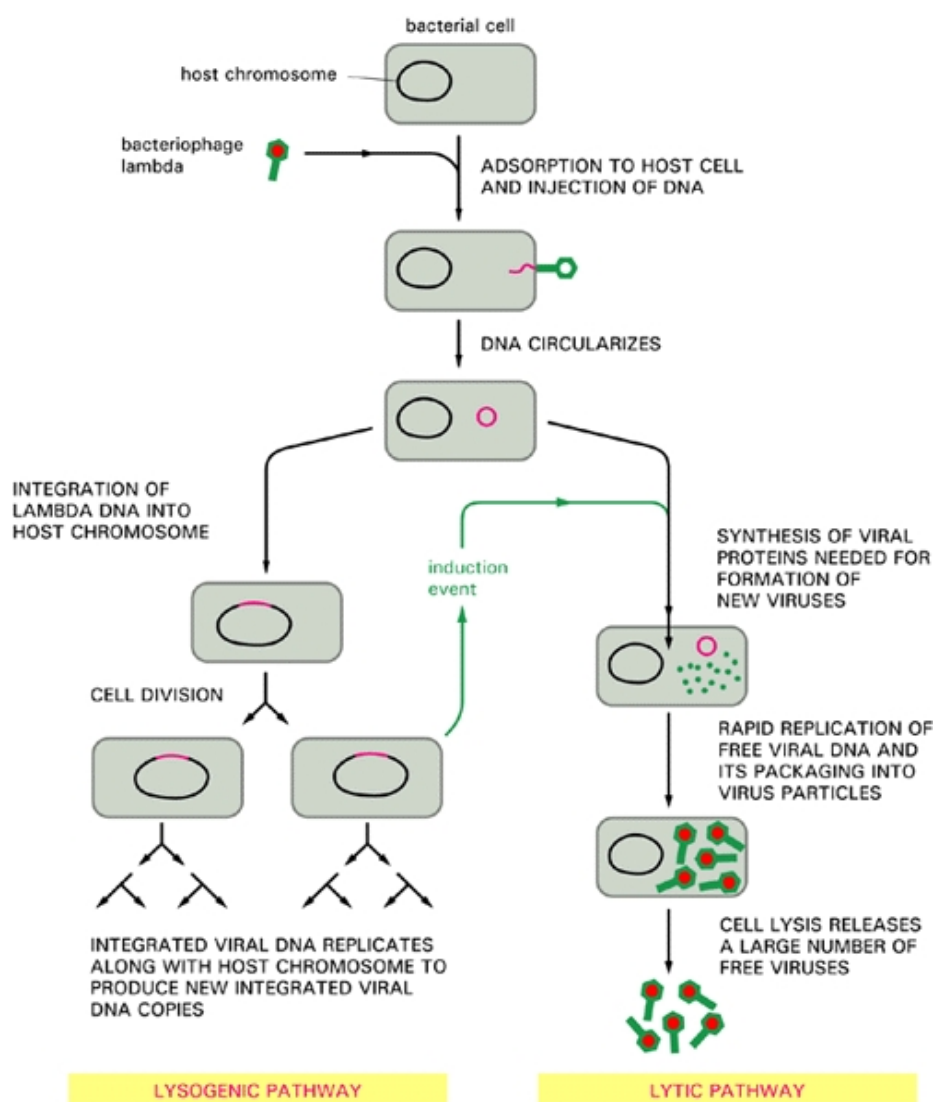


Figura 9 - O ciclo de vida do bacteriófago λ . O bacteriófago se multiplica por uma via lítica ou lisogênica na bactéria *E. coli*. Quando o bacteriófago está crescendo em lisogenia, lesões na célula fazem com que o DNA viral integrado (profago) saia do cromossomo da célula hospedeira passando para o ciclo lítico (Alberts, 1997).

O profago induzível λ é mantido em seu ciclo lisogênico pela ação de uma proteína repressora CI, que bloqueia a transcrição dos genes virais essenciais ao ciclo lítico. No entanto, o estado lisogênico estável é interrompido quando as funções SOS são induzidas, acarretando a clivagem do repressor CI e liberando a expressão dos genes virais (Bakk e Metzler, 2004; Roberts e Devoret, 1983). A clivagem de CI ocorre devido à sua homologia com o repressor SOS LexA dentro de seus domínios carboxi-terminais (Janion, 2008), o que permite que a RecA ativada exerça sua atividade proteásica sobre ambos (Janion 2008; Myles e Sancar, 1989; Walker, 1985). Deste modo, o dano genético, a resposta SOS e o conseqüente desenvolvimento autônomo do profago λ podem ser mensurados através da contagem dos centros infecciosos nas placas, provenientes da lise celular e liberação de partículas virais.

1.6 - Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos

Os testes bacterianos são particularmente indicados para a triagem, detecção e identificação de agentes genotóxicos por oferecerem consideráveis atrativos, como simplicidade, resultados rápidos e baixo custo (Rabello-Gay *et al.*, 1991; Houk, 1992). Contudo, a ausência de enzimas de metabolização impossibilita sua capacidade para identificação de agentes mutagênicos de ação indireta (pró-mutágenos).

O metabolismo exerce papel fundamental na manifestação de efeitos tóxicos e na disponibilidade de uma substância, pois influencia fatores farmacocinéticos importantes como a meia-vida biológica, a duração da exposição, o acúmulo e a eliminação do xenobiótico do organismo, sendo que cada um desses processos pode desempenhar seu papel na tumorigênese (Bartsch e Hietanen, 1996; Rogers, 1994).

Assim, ensaios com animais *in vivo* se tornam importantes para a avaliação da mutagenicidade e/ou antimutagenicidade, por melhor se aproximarem das condições do organismo humano e levarem em consideração elementos como distribuição, metabolismo, detoxificação, mecanismos de reparo do DNA, conjugação e excreção (Butterworth, 2006).

O teste do micronúcleo (MN) em medula óssea *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram atualmente no mercado mundial (Choy, 2001). É o ensaio mais amplamente utilizado na detecção de danos cromossômicos induzidos por agentes clastogênicos, que induzem quebras cromossômicas ou por agentes aneugênicos, que interferem na formação do fuso mitótico (Ribeiro, 2003; Schmid, 1975). Foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos (Schmid, 1976; 1975), mas é também realizado em ratos (George *et al.*, 1990).

Uma das vantagens do ensaio é que pode ser executado em qualquer população de células em constante divisão, sem que seja necessário o conhecimento prévio do cariótipo do animal (Hayashi *et al.*, 1998), sendo a medula óssea de mamíferos uma das regiões mais adequadas, visto que suas células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de divisão (Heddle, 1973).

Atualmente o ensaio tem sido largamente utilizado na avaliação do potencial genotóxico de agentes físicos e químicos (Ding *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2002), no biomonitoramento de populações humanas ocupacionalmente expostas a agentes mutagênicos (Bolognesi *et al.*, 2004; Majer *et al.*, 2001), na pesquisa de compostos inibidores de carcinogênese (Roy *et al.*, 2003; Izzotti *et al.*, 2001) e em estudos ecotoxicológicos (Lorente *et al.*, 2002; Gauthier *et al.*, 1999).

Os micronúcleos (MN), também conhecidos na hematologia como corpúsculos de Howel-Jolly, aparecem nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais (Ribeiro, 2003). Consistem em pequenas massas de cromatina originada de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que se perdem durante a divisão celular, devido aos eventos clastogênicos ou aneugênicos. A taxa espontânea de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) é baixa e consistente, cerca de 3 por 1000 (Rabello-Gay, 1991). São considerados MN clássicos estruturas circulares, delimitadas por membrana, de mesma refringência que o núcleo, porém não ligadas a esse e com um tamanho que corresponda de 1/5 a 1/20

do tamanho do núcleo principal da célula (Schmid, 1975; Heddle, 1973), conforme apresentado na figura 10.

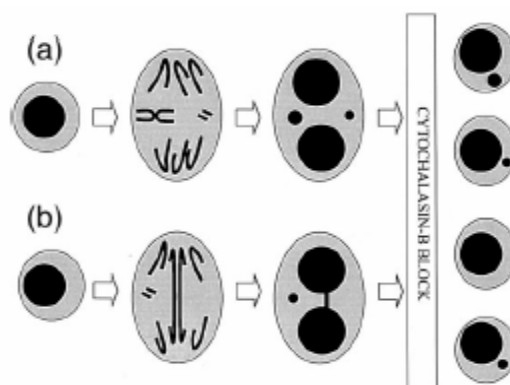


Figura 10 - Formação de micronúcleo em eritroblasto. (a) ação do agente clastogênico com quebra cromossômica. (b) ação do agente no fuso mitótico (Fenech, 2000).

Os eventos que levam à formação do MN podem ser induzidos pelo estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos nos checkpoints do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA e também pela deficiência de nutrientes requeridos como co-fatores no metabolismo do DNA e na maquinaria da segregação cromossômica (Bonassi *et al.*, 2007). Todos esses eventos que causam a formação do MN, como rearranjos cromossômicos, expressão gênica alterada, ou aneuploidia são efeitos associados com a instabilidade cromossômica geralmente observada no câncer (Rajagopalan *et al.*, 2004; Fenech, 2002; Ames e Wakimoto, 2002).

Assim, o Teste do micronúcleo com eritrócitos se baseia no fato de que durante o processo de maturação dos eritroblastos que resulta na formação dos eritrócitos (Fig.11), o núcleo é expulso da célula, de modo que, na ausência de eventos clastogênicos ou aneugênicos, nenhum material cromatídico está presente. Ao contrário do núcleo principal, MN não são expulsos durante o processo de maturação dos eritroblastos e, na presença de agentes que induzam danos cromossômicos, podem ser detectados e computados nas células filhas (Rabello-Gay, 1991; Heddle *et al.*, 1983). Segundo o procedimento original (Schmid, 1976; Heddle, 1973), os MN são contados nos eritrócitos jovens, que durante um período de 10 a 24 horas são

policromáticos (RNA-positivos), corando-se em azul e não em vermelho para a coloração Giemsa convencional. A contagem dos MN apenas neste tipo de célula permite saber que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico (Rabello-Gay *et al.*, 1991).

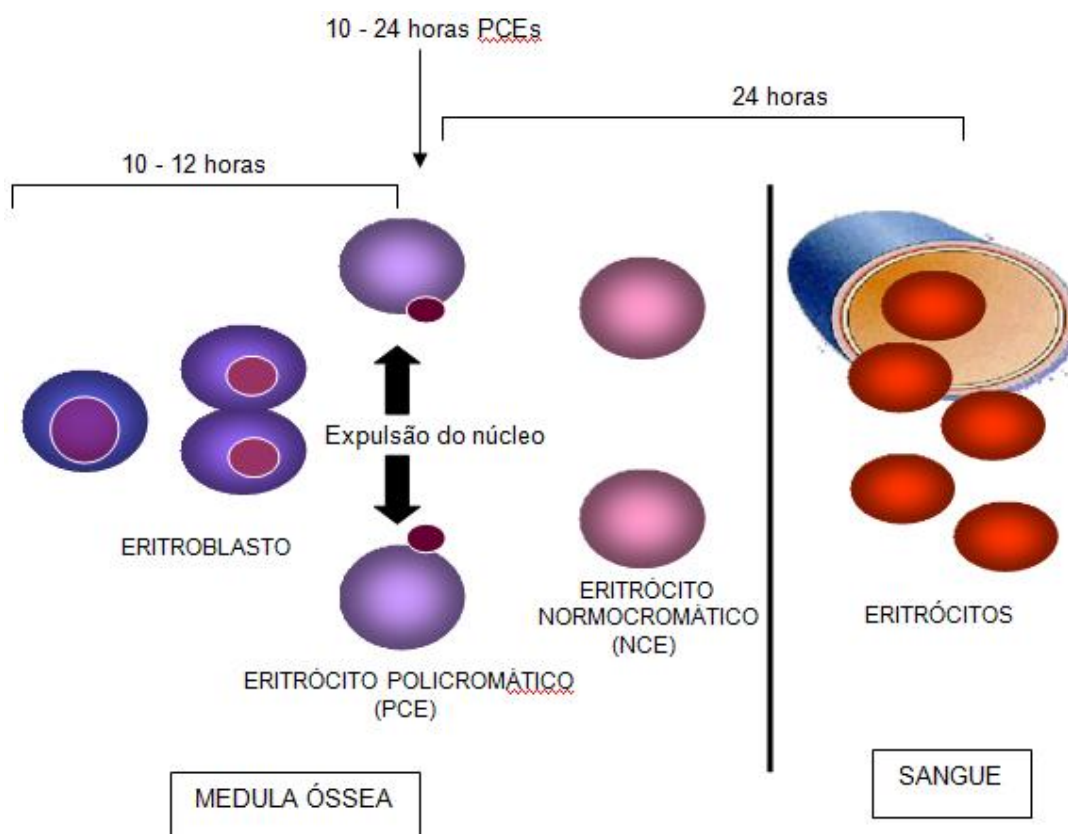


Figura 11 - Resumo do processo de maturação das células de linhagem eritrocitária (Ribeiro, 2003).

De acordo com Mavournin e colaboradores (1990), o período mínimo de aparecimento de MN é de 6 horas, tempo em que deve transcorrer a absorção do agente mutagênico no camundongo, sua metabolização no estágio final do ciclo celular, a eliminação do núcleo do eritroblasto e o aparecimento dos micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea, incluindo os atrasos que podem ocorrer no ciclo de divisão. Além disso, o intervalo mínimo dentro do qual os MN podem ser detectados corresponde à duração do estágio de policromático, entre 10 e 24 horas (Rabello-Gay, 1991).

Outra medida importante do ensaio do MN em medula óssea é a avaliação da citotoxicidade da substância teste. A citotoxicidade é mensurada pela proporção entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/ENC), de modo que a diminuição nesta relação é um parâmetro para a ação tóxica medular e depressão celular (Shahrim *et al.*, 2006).

Devido a sua dinâmica, confiabilidade e sensibilidade, o teste tem sido requisitado pelas agências reguladoras para a avaliação da mutagenicidade de novos compostos (Rodges e Baker, 2000; Torous, *et al.*, 1998). Os resultados positivos obtidos com o Teste do Micronúcleo fornecem fortes evidências da genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada. Sob condições experimentais apropriadas, os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica *in vivo* (Ribeiro, 2003).

2 - OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

- Avaliar as possíveis atividades genotóxica, antigenotóxica e citotóxica do extrato aquoso de folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar as possíveis atividades genotóxica, antigenotóxica e citotóxica do extrato aquoso de folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent pelo Induteste SOS em cepas bacterianas.
- Avaliar as possíveis atividades genotóxica, antigenotóxica e citotóxica do extrato aquoso de folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent pelo Teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extrato aquoso das folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent

As folhas de “esporão de galo” (*Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent) foram coletadas em mata ciliar do município de Campestre – Goiás, Brasil (612 m de altitude, 16° 46’ 0,17” Sul, 49° 42’ 0,06’ Oeste). O material botânico coletado foi identificado pelo Prof^o. Dr. José Realino de Paula – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás (UFG). Uma exsicata encontra-se depositada no herbário da UFG sob o número 40110. O extrato aquoso de *Celtis iguanaea* (ECI) foi extraído, concentrado e cedido pelo Prof^o. Dr. Elson Alves Costa - Departamento de Ciências Fisiológicas - ICB/UFG. Na obtenção do extrato o material foi secado em estufa a 40°C com ventilação forçada e, em seguida, triturado em moinho de facas tipo Willey. O ECI foi obtido por infusão do pó das folhas a 3% a uma temperatura de 80°C por 30 min, com agitação a cada 10 min. Após a filtração a vácuo o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida a uma temperatura de 45°C. O rendimento do extrato foi determinado pelo método do peso seco (20%), e a concentração final obtida foi de 60 mg/ml. As soluções do ECI foram sempre preparadas imediatamente antes do seu uso nos experimentos (De Paula, 2009).

3.2 Materiais utilizados no Induteste SOS

Cepas Bacterianas

Foram utilizadas no presente trabalho as seguintes cepas bacterianas, todas derivadas de *Escherichia coli*:

- cepa lisogênica (WP₂S(λ)).
- cepa indicadora (RJF013).

Soluções, Reagentes e meios de Cultura.

Meio LB

- Triptona (Difco) 10 g
- Extrato de Levedura (Difco) 5 g
- Cloreto de Sódio – (NaCl) (Vetec) 10 g
- Água destilada estéril 1000 ml
- Ágar (Difco) 15 g

Meio LB (1/2) (malt / amp)

- Triptona (Difco) 5 g
- Extratos de levedura (Difco) 2,5 g
- Cloreto de Sódio – (NaCl) (Vetec) 10 g
- Água destilada estéril..... 1000ml
- Ágar (Difco) 15 g
- Maltose (20%) (MERCK) 10 ml
- Ampicilina 0,02mg/ml

Tampão M9

- Fosfato de sódio dibásico – (Na₂HPO₄) (Vetec)..... 3 g
- Fosfato de potássio dibásico – (KH₂PO₄) (Synth)..... 1,5g
- Cloreto de amônia – (NH₄Cl) (Synth)..... 0,5g
- Cloreto de sódio – (NaCl) (Vetec) 0,25g
- Água destilada estéril 500ml
- Cloreto de cálcio – (CaCl₂) (Vetec)..... 2,5ml
- Sulfato de magnésio – (MgSO₄) (Synth)..... 2,5ml

Top-ágar

- Cloreto de Sódio – NaCl (Vetec) 5 g
- Agar (Difco) 6 g
- Água destilada estéril 1000ml

Controle Positivo : Mitomicina C (MMC)

- MMC (Sigma)..... 0,5 µg
- Água destilada estéril 0,1ml

Controle Negativo :

- Água destilada estéril

3.3 Procedimento Experimental Induteste SOS

Avaliação de citotoxicidade: Sobrevivência bacteriana em função da dose de extrato aquoso de *Celtis iguanaea* (ECI):

Com o intuito de determinar a ação citotóxica do esporão de galo foi realizada a curva de inativação celular. O procedimento experimental resume-se da seguinte maneira: A cepa lisogênica WP_{2s}(λ), em fase exponencial de crescimento, foi centrifugada a 3800 rpm por 15 minutos e ressuspensa em igual volume de tampão M9. Amostras de 1 ml dessa cultura foram adicionadas a diferentes doses de ECI (0,5 , 1, 2,5 e 5 mg) e incubadas por 25 minutos a 37°C no shaker. Após, alíquotas dessas culturas foram convenientemente diluídas em tampão M9 e 0,1 ml das culturas diluídas foram espalhadas uniformemente sobre placas de Petri, em duplicatas, contendo meio LB sólido. As placas foram mantidas na estufa a 37°C, por 24 horas. Após esse período, as colônias foram contadas com o auxílio de um contador de colônias. Para a avaliação de anticitotoxicidade realizou-se o tratamento simultâneo de diferentes doses de ECI com uma dose constante de 0,5 µg de MMC. O perfil de inativação celular provocado pelo ECI é expresso pela fração de Sobrevivência (FS), que é a razão entre o número de células viáveis após uma determinada dose [S] e o número de células na placa controle [S₀], sendo o controle negativo o parâmetro para a análise de citotoxicidade e o controle positivo para a avaliação de anticitotoxicidade.

Avaliação do efeito genotóxico e antigenotóxico do ECI.

Os experimentos de indução lisogênica para a avaliação da atividade genotóxica e/ou antigenotóxica foram realizados conforme o procedimento descrito por Moreau (1976). O procedimento experimental resume-se da seguinte maneira: 0,4 ml da cultura pernoite da cepa lisogênica WP_{2s}(λ) foi diluída em 40 ml de meio LB, mantendo uma proporção de 1/100. Essa cultura foi levada ao shaker para incubação a 37°C com agitação constante por 2 horas e 30 minutos. Após terem atingido a fase exponencial de crescimento, foram centrifugadas a 3800 rpm, por 15 minutos, e ressuspensas em igual volume de tampão M9.

Amostras de 1 ml dessa cultura foram adicionadas a tubos contendo diferentes doses de ECI (avaliação de genotoxicidade) ou a tubos contendo

uma dose constante de MMC e diferentes doses de extrato (avaliação de antigenotoxicidade). Os tubos foram incubados a 37°C em shaker por 25 minutos com agitação. Após o período decorrido, as culturas foram convenientemente diluídas em tampão M9 e 0,1 ml de cultura da bactéria lisogênica WP₂S(λ) foi adicionada a 0,3 ml da cultura da bactéria indicadora (RJF013) e em seguida foram misturadas a 2,5 ml de meio gelosado liquefeito (Top-ágar), homogeneizado. O conjunto foi vertido sobre placas, em duplicatas, contendo LB ½ maltose/ampicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Decorrido esse período, foi realizada as contagens dos centros infecciosos em contador de colônias. Os resultados foram computados e as taxas de indução lisogênica expressas pelo Fator de Indução (FI) em função da dose de ECI. O fator de indução é expresso pela razão entre o número de centros infecciosos obtidos a partir da cultura tratada [F], e o número de centros infecciosos a partir da cultura controle [F₀], sendo o Controle negativo o parâmetro para a análise de genotoxicidade (Indução lisogênica espontânea) e o controle positivo para a avaliação de antigenotoxicidade.

As doses de ECI utilizadas tanto para os ensaios de citotoxicidade quanto para genotoxicidade foram de 0,5, 1, 2,5 e 5 mg. O controle positivo foi realizado com Mitomicina C, em uma concentração de 0,5 µg. O controle negativo foi realizado com água destilada estéril.

A análise estatística foi feita utilizando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) e, em seguida, aplicou-se o teste de comparação múltipla (Tukey). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3.4 Materiais utilizados no Teste do Micronúcleo

Camundongos

Foram utilizados 75 camundongos *Mus musculus* (Swiss Webster) out bred, do sexo masculino, pesando entre 30 e 40g com idade de 7 a 12 semanas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Antes da realização do experimento, os animais permaneceram por 7 dias no laboratório, onde foram mantidos em gaiolas de polipropileno com 5 animais cada, forradas com maravalha trocada diariamente, e alimentados com ração comercial e água filtrada, ambos oferecidos "ad libitum". Os animais foram

mantidos a temperatura ambiente de 25°C, umidade 50% ± 20% e um ciclo de luz 12h claro/escuro.

Soluções e Reagentes

Solubilização das células

- Soro fetal bovino, Soralli.

Fixador

- Metanol absoluto (COH₄), Labsynth Produtos para Laboratórios.

Tampão Fosfato

- Fosfato de sódio dibásico – (Na₂HPO₄·12H₂O) Sigma-Aldrich Chem. Co.
- Fosfato de sódio monobásico – (NaH₂PO₄·H₂O) Sigma-Aldrich Chem. Co.

Composição

Solução A	Solução B
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O -----17,9g	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O-----34,5g
H ₂ O destilada -----100 mL	H ₂ O destilada-----500 mL

Tampão Fosfato

- Solução A..... 74ml
- Solução B..... 426ml
- Água destilada estéril 1500ml

Corante

- Giemsa, Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios.
- Tampão fosfato

Composição do Corante Giemsa tamponado*

- Tampão fosfato..... 100ml
- Água destilada estéril 100ml
- Solução Giemsa..... 9ml

*Filtrado em papel filtro

Controle positivo

- Mitomicina C, Bristol-Myers Squibb.

Solução de Mitomicina C

- | | |
|--------------------------------|------|
| ▪ MMC | 5 mg |
| ▪ Água destilada estéril | 5ml |

Controle Negativo :

- Água destilada estéril

3.5 Procedimento Experimental Teste do Micronúcleo

Grupos de 5 camundongos foram tratados via gavagem com ECI nas concentrações de 100, 300 e 500 mg/Kg.) O grupo controle positivo recebeu uma dose única intraperitoneal (i.p.) de 4mg/kg (80% da DL₅₀) de MMC e o grupo controle negativo foi tratado com água destilada. Para a avaliação de antigenotoxicidade, foram administradas as mesmas concentrações juntamente com uma dose única i.p. de 4mg/kg de MMC. Com exceção do controle negativo (apenas 24h), todas as outras doses tiveram tempos de tratamento de 24 e 48 horas. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. As epífises dos fêmures foram cortadas e a medula óssea retirada com 1 ml de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado e o precipitado de células foi homogeneizado. Uma gota de suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro e foi feito o esfregaço celular. Após a secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução de corante Giemsa tamponado por um período de 15 minutos (Heddle, 1973; Heddle *et al.*, 1983). Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em condições ambientais.

Análise Citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum com a finalidade de se detectar fragmentos cromossômicos e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula

óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão (1000x), avaliando-se 2000 EPC em duas lâminas para cada animal. Para a avaliação da citotoxicidade, foram contados 1000 ENC e também computada a frequência de EPC presentes nos mesmos campos, e a razão EPC/ENC foi determinada conforme Schmid (1975).

Análise Estatística

A avaliação de mutagenicidade foi realizada por meio da comparação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN), em 2000 EPC de cada grupo, em relação ao grupo controle negativo ou positivo pelo teste ANOVA. Em seguida, aplicou-se o teste de comparação múltipla (Tukey). Para a avaliação de citotoxicidade as frequências de EPC/ENC de cada grupo foram comparadas pelo teste qui-quadrado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4 - REFERÊNCIAS

ABIFISA. Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico. Uma legislação justa para os produtos de origem natural. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br>.

ADÂMOLI, J.; MACEDO, J; AZEVEDO, L.G.; MADEIRA NETO, J.S.; Caracterização da região dos Cerrados. In: Goedert, W.J.; **Solos dos Cerrados: tecnologias e estratégias de manejo**. Planaltina: Embrapa-CPAC; São Paulo, p. 33 – 74, 1986.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; **Biologia Molecular da Célula.**, 3.Ed., Editora Artes Médicas, PA, p. 281, 1997.

ALMASSY JÚNIOR, A.; LOPES, R.C.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V.W.D.; **Folhas de Chá – plantas medicinais na Terapêutica Humana**. Viçosa, Ed. UFV, 233p., 2005.

ALMEIDA, M.G.; Cultura ecológica e biodiversidade. **Mercator - Revista de Geografia da UFC**, Fortaleza, ano 2, n.3, p.71 - 82, 2003.

ALMEIDA, S.P.A.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F.; **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA/CPAC, 52p., 1998.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P.; Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova.**, São Paulo, v.28, n.1, p. 118 - 129, 2005.

ALONSO, J.; **Tratado de Fitomedicina: Bases clínicas e farmacológicas**. Argentina, Rosário, Ed. Corpus Libros, 1998.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.

AMES, B. N.; Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, Washington DC, v.221, n.4617, p.1256 - 1264, 1983.

AMES, B.N.; GOLD, L.S.; Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. **Environmental and Molecular Mutagenesis.**, Washington, DC, v.14, p. 66 - 77, 1989.

AMES, B.N.; GOLD, L.S.; Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. **Mutation Research**, Amsterdam, v.447, p. 3 - 13, 2000.

AMES, B.N.; WAKIMOTO, P.; Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk?. **Nat. Rev. Cancer.**, v.2, n.9, p. 694 - 704, 2002.

ANDREASSI, M.G.; BOTTO, N; COLOMBO, M.G.; BIAGINI, A.; CLERICO, A.; Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases?. **Environmental and Molecular Mutagenesis.**, v.35, p. 265 - 269, 2000.

ANTUNES, L.M.G.; TAKAHASHI, C.S.; Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research.**, n.419, p. 137 - 143, 1998.

ANTUNES, M.G.; ARAÚJO, M.C.P.; Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Rev. Nutr.**, v.13, n.2, p. 81 - 88, 2000.

APG; An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, p. 399 – 436, 2003.

ARENSON, T.A.; TSODIKOV, O.V.; COX, M.M.; Quantitative analysis of the kinetics of end-dependent disassembly of RecA filaments from ssDNA. **Journal of Molecular Biology.**, v.288, n.3, p. 391 – 401, 1999.

ARUOMA, O.I.; Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research.**, v.523, p.9 – 20, 2003.

BAIS H.P.; WEIR T.L.; PERRY L.G.; GILROY S.; VIVANCO J.M.; The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.57, p.233 – 266, 2006.

BAKK, A.; METZLER, R.; In vivo non-specific binding of λ CI and Cro repressors is significant. **FEBS let.**, v.563, p. 66 - 68, 2004.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D.; Drug Discovery from medicinal plants. **Life Sciences.**, v.78 p. 431 - 441, 2005.

BARROS, S.; ROPKE, C.D.; SAWADA T.C.H.; DA SILVA, V.V.; PEREIRA, S.M.M.; BARROS, S.B.M.; Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of pothomorphe umbellate L. Miq (Pariparoba). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo (SP), v.41, n.1, p. 53 - 61, 2005.

BARTSCH, H.; HIETANEN, E.; The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. **Environ. Health Perspect.**, v.104, p. 569 - 577, 1996.

BERG, C.C.; DAHLBER S.V.; **A revision of *Celtis* subg. *Mertensia* (Ulmaceae)**. The Norwegian Arboretum/Botanical Institute, University of Bergen, Hjeltestad, Norway. **Brittonia**, v.53, p. 66 – 81, 2001.

BITENCOURT, M.D.; MENDONÇA R.R.; **Viabilidade de conservação dos remanescentes de cerrado no estado de São Paulo**. Annablume, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 17, 2004.

BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. **Mutation Research.**, v.557, n.2, p. 109 - 117, 2004.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; GORDANA, J.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FECECH, M.; An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis.**, v.28, n.3, p. 625 - 631, 2007.

BREIVIK, J.; The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. **Sem Cancer Biol.**, v.15, p. 51- 60, 2005.

BROWN, T. A.; **Genética: um enfoque molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro (RJ): Ed. Guanabara Koogan, 336p., 1999.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J.; **Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro (RJ) Ed. Guanabara Koogan, 381p., 1991.

BUTTERWORTH, B.E.; A classification framework and practical guidance for establishing a mode of action for chemical carcinogens. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.45, n.1, p.9 - 23, 2006.

CARNEIRO, M.R.B.; A flora medicinal no centro oeste do Brasil: Um estudo de caso com abordagem etnobotânica em Campo Limpo de Goiás.; **Dissertação de mestrado**. Centro Univ. de Anápolis, UniEVANGÉLICA, Anápolis,GO, 2009.

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K.M.A.; RAO, V.S.N.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A.P.; PESSOA, C.; Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chem. Toxicol.**, v.44, n.3, p.388 - 392, 2006.

CAVALLAZZI, M.; COSTA, L.A.B.; **Plantas medicinais na Atenção Primária à Saúde** - IV Jornada Catarinense de Plantas medicinais, Itajai, SC. 2003.

CHECHINEL - FILHO, V.; YUNES, R.A.; **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Yunes R.A.; Calixto, J.B.; Argos Ed. Univ., Chapecó, 2001

CHEN, W.; WENG, Y.M.; TSENG, C.Y.; Antioxidative and Antimutagenic Activities of Healthy Herbal Drinks from Chinese Medical Herbs. **The American Journal Of Chinese Medicine**. v.31, n.4, p.523 – 532, 2003.

CHEN, Z.J.; PIKAARD, C.S.; Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. **Genes Development.**, v.11 p. 2124 - 2136, 1997.

CHOY, W.N.; Regulatory Genetic toxicology tests. In: CHOY, W. N. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York, p. 93 - 113, 2001.

CHUNG, H.W.; KANG, S.J.; KIM, S.Y.; A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. **Mutation Research.**, v.516, n.1-2, p. 49 - 56, 2002.

COMBES, R.D.; Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, v.24, p. 950 - 954, 1992.

COURCELLE, J.; KHOUDURSKY, A.; PETER, B.; BROWN, P.O.; HANAWALT, P.C.; Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. **Genetics.**, v.158, p. 41 – 64, 2001.

COUTINHO, L.M.; O conceito de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica.**, v.1, p. 17 - 23, 1978.

COWAN, M.M.; Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.12, n.4, p.564 – 582, 1999.

CZECZOT, H.; TUDEK, B.; KUSZTELAK, J.; SZYMCZYK, T.; DOBROWOLSKA; GLINKOWSKA, G.; MALINOWSKI, J.; STRZELECKA, H.; Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. **Mutation Research.**, v.240, p.209 - 221, 1990.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V.; Biomonitoramento Ambiental. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, p.167 - 178, 2003.

DAVIS, P.K.; BRACKMANN, R.K.; Chromatin remodeling and cancer. **Cancer Biol. Ther.**, v.2, p. 22 - 29, 2003.

DE FLORA, S.; BRONZETTI, G; SOBELS, F.H.; Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. **Mutation Research.**, n.267, p. 153 - 155, 1992.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; RANDEATH, K.; RANDEATH, E.; BARTSCH, H.; NAIR, J.; BALANSKY, R.; VAN SCHOOTEN, F.; DEGAN, P.; FRONZA, G.; WALSH, D.; LEWTAS, J.; DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenic relevance and implications in preventive medicine. **Mutation Research.**, v.366, p.197 - 238, 1996.

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

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

D'EREDITTÁ R.; Contact diode laser myringotomy and mitomycin C in children. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v.130, n.6, p. 742 - 746, 2004.

DE PAULA, M.A.; Caracterização Farmacognóstica e Estudo das Atividades Farmacológicas do Extrato Aquoso do Esporão de Galo (*Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent); **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 86p., 2009.

DE ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J.; **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 3. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.

DIAMOND, B.J.; SHIFLETT, S.C.; FEIWEL, N.; MATHEIS, R.J.; NOSKIN, O.; RICHARDS, J.A.; SCHOENBERGER, N.E.; Ginkgo biloba Extract: Mechanisms and Clinical Indications. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v.81, n.5, 2000.

DING, G.R.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSHI, J.; Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. **Mutagenesis.**, v.18, n.5, p. 439 - 443, 2003.

DI STASI, L.C.; **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo, Ed. UNESP, 230p., 1996.

DOWD, S.; TILSON, E.; **Practical Radiation Protection and Applied Radiotherapy**. 2. Ed., Elsevier Science, 368p., 1999.

EITEN, G.; The cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review.**, v.38, p. 201 - 341, 1972.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G.C.; Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.;

MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Ed. UFRGS/UFSC, p.107-122, 2004.

ELDIN, S.; DUNFORD, A.; **Herbal Medicine in Primary Care**. Ed. Elsevier Health Sciences, 192p., 2001.

ELLER, M.S.; ASARCH, A.; GILCHREST, B.A.; Photoprotection in human skin- A multifaceted SOS response. **Photochem. & Photobiol.**, v.84, p. 339 - 349, 2008.

ENGELKE, F.; Fitoterápicos e legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.1, p. 10 -15, 2003.

ERDTMANN, B.; A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Ed. Alcance, p. 21 - 48, 2003.

ESTREM S. A.; VANLEEUEWEN R.N.; Use of mitomycin C for maintaining myringotomy patency. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v.122, p. 8 - 10, 2000.

FABRICANT, T.S.; FARNSWORTH, N.R.; The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ. Health Perspect.**, v.109, p. 69 - 75, 2001.

FARAH, S.B.; **DNA Segredos e Mistérios**. São Paulo: Ed. Sarvier, 276p.,1997.
FARNSWORTH, N.R.; Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the WHO**, v.63, n.6, p. 965 – 981, 1985.

FEARON, E. R.; VOLGELSTEIN, B.; A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v.61, p.759 - 767, 1990.

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

FENECH, M.; Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v.181-182, p. 411 - 416, 2002.

FERGUSON, L.R.; Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Research**, n.307, p. 395 - 410, 1994.

FERNANDEZ, H.A.R.; OGI, T.; AOYAGI, S.; CHAFIN, D.; HAYES, J.J.; OHMORI, H.; WOODGATE, R.; Identification of additional genes belonging to the *lexA* regulon in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v.35, p.1560 - 1572, 2000.

FERREIRA, D.G; ROCHA, J.C.; **Oncologia Molecular**. São Paulo, Ed. Atheneu, 469p., 2004.

FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL; Disponível em: http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php&especie=38

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F.; **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Construindo a história dos produtos naturais. Um Modelo Multidisciplinar**. Divisão de Fitoquímica, Ed. CPQBA/UNICAMP, 2006.

FONSECA, C.A.; PEREIRA, D.G.; Aplicação da genética toxicológica em plantas com atividade medicinal. **Infarma**, v.16, p. 51 - 54, 2004.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W.; **DNA Repair and Mutagenesis**. Academic Press, New York, 698p., 1995.

GARCIA, M.V.; **Princípios Básicos de Genética Toxicológica**. Ed. UNESP. São José do Rio Preto, 127p., 1987.

GATEHOUSE, D. G.; Bacterial mutation assays. In: KIRKLAND, D. J.; **Basic mutagenicity tests**. New York: Cambridge University Press, p. 13 - 50, 1990.

GAUTHIER, J.M.; DUBEAU, H.; RASSART, E.; JARMAN, W.M.; WELLS, R.S. Biomarkers of DNA damage in marine mammals. **Mutation Research.**, v.444, n.2, p. 427 - 439, 1999.

GEBHART, E.; Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research.**, v. 267, p. 211 - 220, 1992.

GEORGE, E.; WOOTTON, A.K.; GATEHOUSE, D.G.; Micronucleus induction by azobenzene and 1,2-dibromo-3-chloropropane in rat : Evaluation of a triple-dose protocol. **Mutation Research.**, v.324, p.129 - 134, 1990.

GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G.; Pratical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation Research.**, v.455, p. 21-28, 2000.

GOMES-CARNEIRO, M.R.; RIBEIRO-PINTO, L.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R.; **Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista.** Cadernos de Saúde Pública, RJ, v.13, p. 27- 38, 1997.

GOODE, E.L.; ULRICH, C.M.; POTTER, J.D.; Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.**, v.1, p.1513 - 1530, 2002.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.; DE M.B.; The diversity of plants. Where is it? Why is it there? What will it become? **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.66, n.1, p.55 - 83, 1994.

GRAY S.D.; TRITLE N.; WENHUA M.S.; The effect of mitomycin on extracellular matrix proteins in a rat wound model. **Laryngoscope.**, v.113, n.2, p. 237 – 242, 2003.

GREENBLATT, M.S.; BENNETT, W.P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C.C.; Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Research.**, v.54, p. 4855 - 4878, 1994.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, T.D.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; Mecanismos de Mutação Gênica. In: **Introdução à Genética.**, 7. ed., Guanabara e Koogan, RJ, p. 465 - 487, 2002.

GUARIM NETO, G.; DE MORAIS, R.G.; Recursos Medicinais de espécies do Cerrado de Mato-Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Bot. Bras.**, v.17, n.4, p. 561 - 584, 2003.

HALBERSTEIN, R.A.; Medicinal Plants: Historical and Cross-cultural usage patterns. **Ann. Epidemiol.**, v.15, n.9, p. 686 - 699, 2005.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry.**, v.30, p. 3864 – 3867, 1991.

HARTMAN, P.E.; SHANKEL, D.M.; Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis.**, n.15, p. 145 - 182, 1990.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, R.; MARTUS, H.J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W.; Use of the alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology.**, v.39, p. 843 - 858, 2001.

HATA, T.; SUGAWARA, R.; Mitomycin, a new antibiotic from Streptomyces. II. Description of the strain. **J. Antibiot.**, v.9, n.3, p.147 - 151, 1956.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UEYNO, K.; WADA, K.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y.; Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v.399, p. 125 - 133, 1998.

HEDDLE, J.A.; A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research.**, v.18, n.2, p.187 - 90, 1973.

HEDDLE, J.A.A.; HUTE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M.F.; The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research.**, v.124, p. 61 - 118, 1983.

HORII, T.; OGAWA, T.; NAKATANI, T.; HASE, T.; MATSUBARA, H.; OGAWA, H.; Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. **Cell.**, v.27, n.3, p.515 – 522, 1981.

HOUK, V.S.; The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. **Mutation Research.**, v. 277, p. 91 - 138, 1992.

HOUTGRAFF, J.H.; VERSMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W. J.; A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovasc. Revasc. Med.**, v.7, p. 165 - 172, 2006.

INCA.; **Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro, 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals** – ICH Harmonized Tripartite Guideline S2B. Federal Register. November 21, 1997.

IZZOTTI, A.; BALANSKY, R.M.; DAGOSTINI, F.; BENNICELLI, C.; MYERS, S.R.; GRUBBS, C.J.; LUBET, R.A.; KELLOFF, G.J.; DE FLORA, S.; Modulation of biomarkers by chemopreventive agents in smoke-exposed rats. **Cancer Res.**, v.61, n.6, p. 2472 - 2479, 2001.

JANION, C.; Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in *Escherichia coli*. **Int. J. Biol. Sci.**, v.4, p. 338 – 344, 2008.

JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M.; **Plantas Medicinais: Cura segura?**. *Química Nova*, v.28, n.3, p. 519 - 528, 2005.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N.; Environmental desmutagens and antimutagens. In: KLEKOWSKI, E.J.; **Environmental Mutagenesis and Plant Biology**., Praeger, New York, p. 137 – 151, 1982.

KADA, T.; SHIMOI, K.; Desmutagens and bio-antimutagens: Their modes of action. **Bio Essays**., v.7, p. 113 - 115, 1987.

KANG, Y.H.; KYUNG-AE, L.; RYU, C.J.; LEE, H.; LIM, J.; PARK, S.N.; PAIK, S.; YOON, D.; Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells. **Cancer Lett.**, v.237, n.1, p. 33 - 44, 2006.

KAPLAN, M. A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; GOTTLIEB, O.R.; Chemical diversity of plants from Brazilian Cerrados. **Academia brasileira de Ciências**., v.66, n.1, p. 50 - 55, 1994.

KHANNA, K.K.; JACKSON, S.P.; DNA Double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nature Genetics**, v.27, p. 247 - 253, 2001.

KISKINIS, E.; SUTER, W.; HARTMANN, A.; High throughput Comet assay using 96-well plates. **Mutagenesis**, v.17, p. 37 - 43, 2002.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; EICHENLAUB-RITTER, U.; DECODIER, I.; Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicol. Lett.**, v.140/141, p. 63 - 74, 2003.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS , J. B.; In: CASARETT & DOULL's TOXICOLOGY: **The basic Science of Poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, Cap. 2 - 5, 1999.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B.; Conservation of the brazilian cerrado. **Conservation Biology**., v.19, p. 707 - 713, 2005.

KNASMULLER, S.; STEINKELLNER, H.; MAJER, B.J.; NOBIS, E.C.; SCHARF, G.; KASSIE, F.; Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. **Food and Chemical Toxicology.**, v.40, n.8, p. 1051 - 1062, 2002.

KONAN, N.A.; BACCHI, E.M.; Lincopan, N.; Varela, S.D.; Varanda, E.A.; Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology.**, v.110, p. 30 - 38, 2007.

KOPELOVICH, L.; CROWELL, J.A.; FAY, J.R.; The epigenome as a target for cancer chemoprevention. **J Natl Cancer Inst.**, v. 95, p. 1747 - 1757, 2003.

KURODA, Y.; JAIN, A.K.; TEZUKA, H.; KADA, T.; Antimutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research.**, v.267, p. 201 - 209, 1992.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M.; Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: **Introduction: Defining the problem of neurotoxicity.** Ed. National academic press, Washington D.C., p. 9 - 19, 2004.

LEHMANN, M.; GRAF, U.; REGULY, M.L.; DE ANDRADE, H.H.R.; Interference of Tannic Acid on the genotoxicity of Mitomicyn C, Methylmethanesulfonate and Nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis.**, v.36, n.3, p.195 - 200, 2000.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M.; **Princípios de Bioquímica.**, 4 ed., Editora Sarvier, 1202p., 2006.

LEVITT, P. S.; ZHU, M.; CASSANO, A.; YAZINSKI, S. A.; LIU, H.; DARFLER, J.; PETERS, R. M.; WEISS, R. S.; Genome maintenance defects in cultured cells and mice following partial inactivation of the essential cell cycle checkpoint gene Hus1. **Mol Cell Biol.**, v.27, n.6, p. 2189 - 2201, 2007.

LEWIS, L.K.; HARLOW, G.R.; GREGG-JOLLY, L.A.; MOUNT, D.W.; Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology.**, v.241, n.4, p. 507 – 523, 1994.

LIJINSKI, W.; A view of the relation between carcinogenesis and mutagenesis. **Environmental Molecular and Mutagenesis.**, v. 14, n.16, p. 78 - 84, 1989.

LITTLE, J.W.; Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease, **Biochimie.**, v.73, p. 411 - 422. 1991.

LIVIERO, L.; VON BORSTEL, R.C.; The 4th International conference of mechanisms of antimutagenesis anticarcinogenesis: a summary. **Mutation Research.**, n.350, p. 287 - 293, 1996.

LOPES, A.S.; **Solos sob cerrado, características, propriedades e manejo.** Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato., Piracicaba, 35p., 1983.

LOPES, A.S.; Correção e adubação dos solos dos cerrados. In: **Potencial agrícola dos cerrados**, Fundação Cargill., Goiânia, p. 57-59, 1985.

LORENTE, M.T.; MARTOS, A.; CASTANO, A.; Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. **Ecotoxicology.**, v.11, n.1, p. 27 - 34, 2002.

LOURO, I.D.; **Genética Molecular do Câncer.** 2 ed., SP, MSG, 426 p., 2002.

LUIZ, R.C.; Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei* Murill (Cogumelo do Sol) linhagem AB97/11, in vitro. **Dissertação de Mestrado** – Instituto Agrônômico do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A.; **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova, vol. 25, n.3, p. 429 - 438, 2002.

MACHADO, R.B.; RAMOS NETO, M.B.; PEREIRA, P.G.P.; CALDAS, E.; GONÇALVES, D.A.; SANTOS, N.S.; TABOR, K.; STEININGER, M.; **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro.** Relatório Técnico Conservação Internacional, Brasília, DF, 2004.

MACHADO, R.B.; AGUIAR, L.M.S.; CASTRO A.J.F.; NOGUEIRA, C.; **Caracterização da fauna e flora do Cerrado.** XI Simpósio Nacional sobre o Cerrado e o II Simpósio Internacional sobre Savanas Tropicais, Brasília, DF, 2008.

MAJER, B.J.; LAKY, B.; KNASMULLER, S.; KASSIE, F.; Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutation Research.**, v.489, n.2-3, p. 147 - 172, 2001.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B.; Biomonitorização do dano genético em humanos. In: SILVA,J.; ERDTMANN,B.; HENRIQUES, J.A.P.; **Genética Toxicológica.**, Porto Alegre: Editora Alcance, p.183 - 205, 2003.

MANTOVANI, J.E.; PEREIRA, A.; **Estimativa da integridade da cobertura de vegetação do Cerrado através de dados Landsat - TM.** In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Santos, SP, 1998.

MARON, D. M.; AMES, B. N.; Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research.**, v.113, p. 173 - 215, 1983.

MARTIN, G.J.; **Ethnobotany: a methods manual.** London, Chapman & Hall, 268p., 1995.

MAVOURNIN, K.H.; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C.; The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research.**, v.239, p. 29 - 80, 1990.

MELO, M.E.B.; Investigação da genotoxicidade de larvicidas biológicos e sintéticos utilizados para controle de *Aedes aegypti* – **Tese de Doutorado**. Univ. Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 128p., 2009.

MICHEL, B.; After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. **PLoS Biol.**, v.3, n.7, e255, 2005.

MILES, G.M.; SANCAR, A.; DNA repair. **Chem. Res. Toxicol.**, v.2, p. 197 - 226, 1989.

MILLS, S.; BONE, K.; Principles of pharmacology. In: **Principles and practice of phytotherapy: modern herbal medicine.**, London, Ed. Churchill Livingstone, p. 22 - 79, 2000.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL. Biodiversidade Brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: (Biodiversidade, 5), **MMA/SBF**, 2002.

MITSCHER, L.A.; DRAKE, S.; GOLLAPUDI, S.R.; OKWUTE, S.K.; A modern look at folkloric use of anti-infective agents. **J. Nat. Prod.**, v.50, n.6, p. 1025 – 1040, 1987.

MITSCHER, L.A.; TELIKEPALLI. H.; MCGHEE, J.; SHANDEL, D.S.; Natural antimutagenic agents. **Mutation Research.**, n.350, p. 143 - 152, 1996.

MONTESANO, R.; VAINIO, H.; BARTSCH, H.; YAMASAKI, H.; **Long-Term and Short-Term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal.** International Agency for Research on Cancer., 580p., 1987.

MOREAU, P.; BAILONE A.; DEVORET, R.; Prophage λ induction in *Escherichia coli* K-12 uvrA uvrB: A highly sensitive test for potential carcinogens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v.73, p. 3700 - 3704, 1976.

MOREAU, P.L.; Mécanismes de la mutagénèse et de l'induction lisogénic. **Principe des tests bactériens pour la detection des cancérogènes et antitumoraux potentials.**, v.6, n.4, 1981.

MUSTARD, J.A.; LITTLE, J.W.; Analysis of *Escherichia coli* RecA interactions with LexA, lambda CI, and UmuD by site-directed mutagenesis of *recA*. **J. Bacteriol.**, v.182, p. 1659 - 1670, 2000.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J.; Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853 - 858, 2000.

NATARAJAN, A.T.; Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research.**, v. 504, n.1-2, p. 3 -16, 2002.

NIAS, A.H.W.; **An Introduction to Radiobiology.** 2 ed., Wilwey, Chichester, England, p.4, 1998.

OLIVEIRA-JÚNIOR, H.J.; SHIMABUKURO, Y.E.; Mapeamento da cobertura da terra dos Estados de Goiás e Tocantins utilizando imagens do sensor MODIS. In: **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto (SBSR)**, Anais São José dos Campos: INPE, p. 1641-1648, 2005.

O'REILLY R.C.; GOLDMAN S.A.; WIDNER S.A.; CASS S.P.; Creating a stable tympanic membrane perforation using mitomycin C. **Otolaryngol Head Neck Surgery.**, v.124, n.1, p. 40 – 45, 2001.

PEREIRA, C. A.; **Plantas Tóxicas e Intoxicações na Veterinária**. Ed. UFG - GO, 1992.

PIERCE, B.A.; Cromossomos e reprodução celular. **Genética: Um enfoque conceitual**., 1. Ed., Guanabara-Koogan, p. 16 - 43, 2004.

PILATI, R.; SOUZA, L.A.; Morfoanatomia da plântula de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. (Ulmaceae). **Acta Sci. Biol. Sci.**, Maringá, v.28, n.1, p. 1 - 6, 2006.

PILIACKAS, V.D.D.; PILIACKAS, J.M.; BARBOSA, L.M.; SILVA, J.L.JR.; CANUTO, M.H.; Análise Etnobotânica das Plantas Medicinais e sua Influência sobre o Ambiente da Cidade de Diamantina, Minas Gerais (MG), Brasil. **Publs. Avulsas do Instituto Pau Brasil**., n.10, dez. 2001.

PINTO, L.F.R.; FELZENSZWALB, I.; Genética do câncer humano. In: RIBEIRO, L.R; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K.; **Mutagênese Ambiental**., Editora Ulbra, p. 29 - 48, 2003.

PIRES, M. O.; Cerrado: Sociedade e biodiversidade. In: IORIS, E.; **Plantas Medicinais do Cerrado: perspectivas comunitárias para a saúde, o meio ambiente e o desenvolvimento sustentável. Mineiros/GO**. Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior: Projeto Centro Comunitário de Plantas Medicinais, p.155-173, 1999.

PREVEDELO, J.A.; CARVALHO, C.J.B.; Conservação do Cerrado brasileiro: o método pan-biogeográfico como ferramenta para a seleção de áreas prioritárias. **Natureza e conservação**., v.4, n.1, p. 39 - 57, 2006.

PURVES, D.; HARVEY, C.; TWEATS, D.; LUMLEY, C.E.; Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**., v.10, n.4, p. 297 - 312, 1995.

RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R.; **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese – Métodos e Critérios de Avaliação**. Ed. Sociedade Brasileira de Genética, Revista Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, 246p., 1991.

RADMAN, M.; Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis. **Basic Life Sciences.**, v.5A, p. 355 - 367, 1975.

RAJAGOPALAN, H.; JALLEPALLI, P.V.; RAGO, C.; VELCULESCU, V.E.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B.; LENGAUER, C.; Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. **Nature**, v.428, n.6978, p. 77 - 81, 2004.

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

RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J.F.; The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of botany** , v.80, p. 223 - 230, 1997.

RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J.F.; Biodiversity patterns of the woody vegetation of the Brazilian Cerrado. In: **Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests**, p. 31 - 66, 2006.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology.**, v. 20, n.12, p. 522 - 531, 2002.

REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GRESPAN, R., CUMAN, R.K.N.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, D.; Toxicological studies on *Stryphnodendron Adstringens.*, **J. of Ethnopharm.**, v.83, p. 101 – 104, 2002.

RENNER, H.W.; *In vivo* effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. **Mutation Research.**, v.244, n.2, p.185 -188, 1990.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T.; Fitofisionomia do Bioma Cerrado. *In*: Sano, S.M.; Almeida, S.P.; **Cerrado Ambiente e Flora**. Ed. EMBRAPA-CPAC (Planaltina/ DF) cap.3, p. 87-166, 1998.

RIBEIRO, F.A.Q.; BORGES, J.P.; ZACCHI, F.F.S.; GUARALDO, L.; O comportamento clínico e histológico da pele do rato submetida ao uso tópico e injetável de mitomicina C. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v.69, n.2, p.151 - 158, 2003.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E.K.; A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. *In*: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K; **Mutagênese Ambiental**. Editora ULBRA, p. 21 - 27, 2003.

RIBEIRO, L.R.; Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. *In*: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K; **Mutagênese ambiental.**, Editora ULBRA, p. 173 - 198, 2003.

ROBERTS, J.W.; DEVORET, R.; Lysogenic Induction. *In*: HENDRIX, R.W.; **Lambda.**, New York: Cold Spring Harbour, p. 123 - 144, 1983.

RODGERS, B.E.; BAKER, R.J.; Frequencies of micronuclei in bank voles from zones of high radiation at Chornobil, Ukraine. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.19, n.6, p. 1644 - 1648, 2000.

ROGERS, A.S.; The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. **J. Adolescent Health.**, v.15, p. 635 - 640, 1994.

ROSS, C.A.; MARGOLIS, R.L.; Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. **Clin. Neurosc. Res.**, v.5, p. 3 -14, 2005.

ROUSE, J.; JACKSON, S.P.; Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. **Science**, v.297, p. 547 - 551, 2002.

ROY, M.; CHAKRABARTY, S.; SINHA, D.; BHATTACHARYA, R.K.; SIDDIQI, M.; Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. **Mutation Research.**, v.523-524, p. 33 - 41, 2003.

SANTOS, D.B.; Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (Algodãozinho-do-campo) pelo teste do micronúcleo em camundongos *Mus musculus*. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biológicas, Univ. Federal de Goiás. Goiânia, 67p., 2002.

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

SATTARIAN, A.; Contribution to the biosystematics of *Celtis* L. (Celtidaceae) with special emphasis on the African species.; PhD thesis, Wageningen University, Wageningen., 150p., 2006.

SCHLACHER, K.; PHAM, P.; COX, M.M.; GOODMAN, M.F.; Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation. **Chem. Rev.**, v.106, n.2, p. 406 – 419, 2006.

SCHMID, W.; The micronucleus test. **Mutation Research.**, v.31, n.1, p. 9 - 15, 1975.

SCHMID, W.; The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: HOLLAENDER, A.; **Chemical mutagens : Principles and methods for their Detection.**, Ed. Plenum Press, New York, vol.4, p. 31 - 53. 1976

SHAHRIM, Z.; BAHARUDDIN, P.J.N.M.; YAHYA, A.; MUHAMMAD, H.; BAKAR, R.A.; ISMAIL, Z.; The in vivo rodent micronucleus assay of kacip fatimah (*Labisia pumila*) extract. **Trop Biomed.**, v.23, p. 214 - 219, 2006.

SILVA, C.S.P.; PROENÇA, C.E.B.; Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. **Acta bot. bras.**, v.22, n.2, p. 481 - 492, 2008.

SIMIC, D.; VUKOVIC-GACIC, B.; KNECEVIC-VUKCEVIC, J.; Detection of natural bio-antimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. **Mutation Research.**, n.402, p. 52 - 57, 1998.

SIMMONS, M.J.; SNUSTAD, D.P.; **Fundamentos de genética**. 2. ed., Guanabara Koogan, 756p., 2001.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMAN, J.R.; **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Ed. UFRGS, Porto Alegre, 1986.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS / Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 821p., 2001.

SNYDER, R.D.; GREEN, J.W.; A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research.**, v.488, p. 151 - 169, 2001.

SOEJARTO, D.D.; Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, v.51, p. 1 – 15, 1996.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H.; **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 640p., 2005.

TAKAHASHI,E.; MARCZYLO, T.H.; WATANABE, T.; NAGAI, S.; HAYATSU, H. and NEGISHI, T.; Preventive effects of anthraquinone food pigments on the DNA damage induced by carcinogens in *Drosophila*. **Mutation Research.**, v.480-481, p. 139 - 145, 2001.

TAKAHASHI, C.S.; Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES,E.K.; **Mutagênese Ambiental.**, Ed. ULBRA, p. 151 - 168, 2003.

TEIXEIRA, R.DE O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M.S. VICENTINI, V.E.P.; Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in vivo assays. **Genet. Mol. Biol.**, v.26, n.4, p. 551 - 555, 2003.

THLIVERIS, A.T.; LITTLE, J.W.; MOUNT, D.W.; Repression of the *E coli recA* gene requires at least two LexA protein monomers. **Biochimie.**, v.73, n.4, p. 449 - 456, 1991.

TING, A.H.; MCGARVEY, K.M.; BAYLIN S.B.; The cancer epigenome: components and functional correlates. **Genes Development.**, v.20, n.23, p. 3215 - 3231, 2006.

TOROUS, D.K.; DERTINGER, S.D.; HALL, N.E.; TOMETSKO, C.R.; An automated method for discriminating Aneugen vs. Clastogen - induced micronuclei. **Environmental and Molecular Mutagenesis.**, v.31, p. 340 - 344, 1998.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia.**, 4. Ed., SP, 720p., 2004.

TRICHOPOULOU, A.; KATSOUYANNI, K.; STUVER, S.; TZALA, L.; GNARDELLIS, C.; RIMM, E.; TRICHOPHOULOS, D.; Consumption of olive oil and especific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. **J. Natl. Cancer Inst.**, n.87, p. 110 - 116, 1995.

VARANDA, E. A.; **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.27, n.1, p.1 - 7, 2006.

VENDRUSCOLO, G.S.; MENTZ, L.A.; Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v.20, p. 367 – 382, 2006.

WAGNER, J.; CRUZ, P.; KIM, S.R.; YAMADA, M.; MATSUI, K.; FUCHS, R.P.; NOHMI, T.; The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. **Mol. Cell.**, v.4, p. 281 - 286, 1999.

WAGNER, H.; WISENAUER, M.; **Fitoterapia – Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WAKAKI, S.; MARUMO, H.; TOMIOKA, K.; SHIMIZU, M.; KATO, E.; KAMADA, H.; Purification and isolation study on gancidins. **J. Antibiot.**, v.11, n.4, p.150 - 155, 1958.

WALKER, G.C.; Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. **Microbiol Rev.**, v.48, n.1, p. 60 – 93, 1984.

WALKER, G.C.; Inducible DNA repair systems. **Annu. Rev. Biochem.**, v.54, p. 425 - 457, 1985.

WALKER, G.C.; The SOS responses of *Escherichia coli*. In: CURTIS, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN, E.C.C.; LOW, K.B.; MAGASANICK, B.; REZNICOFF, W.S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H.E.; ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology.**, American Society for Microbiology, v.1, p. 1400 – 1416, 1996.

WATERS, M.D.; BRADY, A.L.; STACK, H.F.; e BROCKMAN, H.E.; Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research.**, v.238, p. 57 - 85, 1990.

WESTMAN, J.A.; **Genética Médica**. Ed. Guanabara Koogan, RJ, 220p., 2006.

WILLIAMSON, E.M.; Synergy – myth or reality?. In: **Herbal medicine: a concise overview for professionals.**, Oxford, Ed. Butterworth-Heinemann, p. 43 – 58, 2000.

WOGAN, G.N.; HECHT, S.S.; FELTON, J.S.; CONNEY, A.H.; LOEB, L.A.; Environmental and chemical carcinogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, v.14, n.6, p. 473 – 486, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2008.** International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2009.

WWF e PROCER - FUNDO MUNDIAL PARA A NATUREZA. **De grão em grão o cerrado perde espaço.** Impactos do Processo de Ocupação. Brasília: WWF/Fundação Pró-Cerrado. 1995. 66p.

ZAHA, A.; **Biologia Molecular Básica.** 2. Ed, PA, Ed.Mercado Aberto, 2000.

5 - PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Capítulo I

5.1 Manuscrito - Assessment of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent by the lysogenic induction test (SOS Inductest)

Capítulo II

5.2 Manuscrito - Assessment of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent by micronucleus test in mice bone marrow.

Capítulo I

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent PELO TESTE DE INDUÇÃO LISOGÊNICA (INDUTESTE SOS)

FLAVIO FERNANDES VELOSO BORGES

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Geral

Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese

Assessment of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent by the Lysogenic induction test (SOS Inductest)

Flavio Fernandes Veloso Borges, Thiago Machado Chaves, Lee Chen-Chen*

**Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Campus-II Goiânia, Goiás, Brazil*

N^o. Figures: 0

*Titulo abreviado: Toxicity assessment of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent*

Address to correspondence:

*Profa. Dra. Lee Chen Chen

Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Post Box No. 131, Campus-II 74001-970, Goiânia – GO, Brazil

Tel.: + 55-62-3521-1483; fax: + 55-62-3521-1190

E-mail: *chenleego@yahoo.com.br*

Abstract

Celtis iguanaea (Jacq.) Sargent is a member of the Cannabaceae family and popularly known as “esporão de galo”. Ethnobotanical surveys of cerrado native plants show that the tea leaves of *C. iguanaea* is used in traditional medicine for body aches, asthma, cramps, indigestion, urinary infections, kidney disfunctions, as a stimulant or as a diuretic. The purpose of the present work was to evaluate the possible cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects of the aqueous extract of *C. iguanaea* leaves using the prophage λ induction test (SOS inductest). We used lysogenic WP2s (λ) and indicator RJF013 strains, derived from *Escherichia coli*. WP2s (λ) cultures were treated with different doses of the extract (0.5, 1, 2.5, and 5 mg) to evaluate genotoxicity or co-treated with a single dose of MMC (0,5 μ g) and different doses of extract to assess antigenotoxicity. Then, the treated culture was added to the indicator strain (RJF013) and both were poured on plates in LB_{0.2} medium. All cultures were incubated for 24 h at 37 ° C. For the evaluation of cytotoxicity, cultures of WP2S (λ) treated with different concentrations of extract were diluted in M9 buffer and plated on LB medium. Subsequently, the total number of colonies and the number of infectious centers were computed to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity, respectively. The results showed no genotoxicity or cytotoxicity. However, we observed anticytotoxic and partial antigenotoxic activities of the *Celtis iguanaea* leaves extract.

Keywords: Lysogenic induction, *Celtis iguanaea*, Genotoxicity, Antigenotoxicity, Cytotoxicity, *Escherichia coli*

Resumo

Avaliação das atividades citotóxica, genotóxica e antigenotóxica de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent pelo teste de indução lisogênica (INDUTESTE SOS)

Celtis iguanaea (Jacq.) Sargent é um membro da família Cannabaceae e popularmente conhecida como “esporão de galo”. Levantamentos etnobotânicos de plantas nativas do cerrado evidenciam que o chá das folhas de *C. iguanaea* é usado popularmente para dores no corpo, asma, cólicas, má-digestão, infecções urinárias, disfunções renais, como estimulante ou como diurético. O presente trabalho teve como objetivo detectar os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e antigenotóxicos do extrato aquoso das folhas de *C. iguanaea*, utilizando-se o teste de indução do profago λ (Induteste SOS). Foram utilizadas as cepas lisogênica WP2s(λ) e indicadora RJF013, ambas derivadas de *Escherichia coli*. Culturas de WP2s(λ) foram tratadas com diferentes concentrações de extrato (0.5, 1, 2.5, e 5 mg) (avaliação de genotoxicidade) ou co-tratadas com uma dose única de MMC (0,5 μ g) e diferentes concentrações de extrato (avaliação de antigenotoxicidade). Em seguida, a cultura tratada foi adicionada à cepa (RJF013) e ambas foram semeadas em placas em meio LB₁₀₀. Todas as culturas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Para a avaliação de citotoxicidade, culturas de WP2s(λ) tratadas com diferentes concentrações do extrato foram diluídas em tampão M9 e semeadas em placas LB. Posteriormente, o número total de colônias e o número de centros infecciosos foram computados para a avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade, respectivamente. Os resultados mostraram ausência de ação genotóxica e citotóxica. No entanto foi observada atividade anticitotóxica e uma parcial antigenotoxicidade do extrato das folhas de *Celtis iguanaea*.

Palavras-chaves: Indução lisogênica, *Celtis iguanaea*, Genotoxicidade,

Antigenotoxicidade, Citotoxicidade, *Escherichia coli*

1. Introduction

Since the prehistoric era, plants have been the basis for nearly all medicinal therapy until synthetic drugs were developed in the nineteenth century (Djeridane *et al.*, 2006). Currently, according to the World Health Organization (WHO), more than 80% of the world population use plants as a primary source of various medicinal agents, and a significant number of synthetic drugs were obtained from natural precursors (Raskin *et al.*, 2002).

However, even though natural compounds are often assumed to be safe due to their traditional use, they can also cause damage, including to the DNA, leading to genetic instability and related diseases such as cancer (Marques *et al.*, 2003). Fortunately, scientific attention has turned not only to verify the pharmacological and therapeutic properties of medicinal plants, but also assess its potential toxicological activities (Rebecca *et al.*, 2002). Several studies have reported that a great number of plant species used as food ingredients or in traditional medicine present genotoxic, carcinogenic, or toxic properties (Déciga-Campos *et al.*, 2007; Mohd-Fuat *et al.*, 2007), while others were identified with antigenotoxic and chemopreventive activity in the presence of an inducing agent (Chen *et al.*, 2003; Ames, 1983).

Short-term assays have been used for more than 30 years to identify, using cells or organisms, the genotoxins potential to induce mutations and DNA lesions in somatic and/or germinative cells (Da Silva *et al.*, 2003). The genetic toxicity is not a direct measure of carcinogenicity, but is often used as an indicator for cancer, since the mutagenicity tests measure an initial or intermediary event in tumorigenesis (Fearon and Vogelstein, 1990). The relationship between mutations and neoplasms is well known, chemical carcinogens are mostly positive when tested for mutagenicity, while non-carcinogenic drugs usually show negative results (Lijinsky, 1989). In this way, the

investigation of traditionally used medicinal plants is valuable as a source of potential chemotherapeutic drugs, and as a measure of safety for the continued use by the population (Verschaeve *et al.*, 2004).

Celtis iguanaea (Jacq) Sargent is a member of the Rosales order and popularly known as “esporão de galo” (Souza *et al.*, 2005). The genus *Celtis* was included in the Ulmaceae family, subfamily Celtidaceae (Sattarian, 2006), but recent studies placed *Celtis* as a member of the Cannabaceae family (APG, 2003). *Celtis iguanaea* is distributed all across America, from the southern United States to Argentina (Berg and Dahlberg, 2001). The infusion of this plant leaves is used in popular medicine for treatment of body pains, asthma, colic, indigestion, urinary infections, kidney disfunctions, as stimulant and as a diuretic (Carneiro, 2009; Silva and Proença, 2008; Piliackas, *et. al.*, 2001). According to the ethnobotanical survey of cerrado native plants performed by Silva and Proença (2008), *Celtis iguanaea* showed a considerable consensus of popular usage, which may indicate potential medical properties and strengthen the need of proper pharmacological and toxicological studies (Vendruscolo and Mentz 2006).

Short-term assays have been used for more than 30 years to identify chemical, physical, and biological genotoxic agents, as well as to assess their carcinogenic potential. One of those assays that are based in the induction of the SOS functions in *E. coli* is the SOS Inductest (Moreau *et al.*, 1976).

The SOS response is the most studied transcriptional response to DNA damage in *Escherichia coli* (Walker, 1996), and basically consists in the regulation of SOS-induced genes by LexA and RecA proteins, LexA is a transcriptional repressor, and RecA is a co-protease that helps LexA self-cleavage (Walker, 1984). The Inductest-SOS is based on a quantitative evaluation of one of the SOS functions, which is the self-

cleavage of the CI protein (phage (λ) repressor) mediated by RecA co-protease (Little, 1991). Some phages are normally in a latency state in lysogenic bacteria (prophages), being able to trigger lytic development as an expression of SOS functions when the cell's DNA is injured or their replication is blocked by genotoxic agents (Moreau et al., 1976; 1981). By monitoring these functions we can assess the genotoxic activity of any substance (Moreau, 1981).

Thus, considering the widespread use of *Celtis iguanaea* in traditional medicine, the purpose of the present study was to evaluate the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* extract by the prophage λ induction test (Inductest-SOS) in bacterial strains.

2. Material and Methods

2.1 *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent extract (CIE)

The leaves of *C. iguanaea* were collected in riparian forest, municipality of Campestre - Goiás, Brazil. The botanical material was identified and a voucher specimen deposited in the herbarium of the Universidade Federal de Goiás (UFG) under the number 40110. The *C. iguanaea* aqueous extract (CIE) was extracted and concentrated by the following procedure: The material was dried in an oven at 40°C with forced ventilation and then ground into a powder. The CIE was obtained by infusion of the powder 3% at a temperature of 80°C for 30 min, with agitation every 10 min. After vacuum filtration the filtrate was concentrated under reduced pressure at a temperature of 45°C. The yield of the extract was determined by the dry weight method (20%), and the final concentration was 60 mg/ml. The CIE solutions were always prepared immediately before their use in the experiments.

2.2 Experimental procedure

The lysogenic induction experiments to evaluate the genotoxic and antigenotoxic activity were performed according to Moreau, 1976. An overnight culture of the lysogenic WP2s (λ) strain was diluted in LB medium (1% bacto tryptone – Difco; 0.5% yeast extract – Difco; 1% NaCl – Vetec), maintaining a ratio of 1/100. This culture was then brought to the shaker for incubation at 37°C. After reaching the exponential growth phase, the culture was centrifuged at 3800 rpm for 15 minutes, and resuspended on an equal volume of M9 buffer (0.6% Na₂HPO₄ – Vetec; 0.3% KH₂PO₄ – Synth; 1% NH₄Cl – Synth; 0.05% NaCl – Vetec; 0.5% CaCl₂-Vetec; 0.5% MgSO₄-Synth). Further, 1 ml aliquots of culture were incubated with different doses of CIE (assessment of genotoxicity) or with a single dose of Mitomicin C (MMC) and different doses of CIE (antigenotoxicity evaluation) for 25 minutes at 37°C. The CIE doses used for both cytotoxicity and genotoxicity assays were the same (0.5, 1, 2.5, and 5 mg), and positive (0.5 µg/plate of MMC – Sigma) and negative (200 µl of sterile distilled water) controls were also included. After the treatment, cultures were conveniently diluted in M9 buffer, and 0.1 ml of the treated lysogenic strain WP2s (λ) was added to 0.3 ml of the indicator strain RJF013 and 2.5 ml of top agar (0.6% agar – Difco; 0.5% NaCl-Vetec). The set was poured on LB_{(1/2)(malt/amp)} plates, in duplicates, at 37°C for 24 hours. After this period, the number of plaques were counted, and the rates of lysogenic induction calculated by the Induction Factor (IF). The IF is expressed by the ratio between the number of plaques obtained from the treated culture, and the number of plaques from the control culture. The parameters are the negative control for the genotoxicity analysis (spontaneous lysogenic induction) and the positive control for antigenotoxicity evaluation.

In order to assess the cytotoxic activity of the CIE, 0.1 ml of the treated WP2s(λ) culture, diluted in M9 buffer, were inoculated into LB plates and incubated for 24 h at 37 °C. For the anticytotoxicity evaluation, a simultaneous treatment with different doses of CIE and a single dose of MMC (0.5 μ g) was held. After this period, the number of colonies was counted, and the rates of cell inactivation calculated by the survival fraction (SF). The SF is expressed by the ratio between the number of viable cells after a given dose, and the number of cells from the control culture. The parameters are the negative control for the cytotoxicity analysis (spontaneous cell inactivation) and the positive control for anticytotoxicity evaluation.

2.3 Statistical analyses

The results obtained with the survival and genotoxicity assays were generated by three independent experiments carried out in duplicate. The data was obtained by the ratio between the number of surviving colonies in the test plates and the number of surviving colonies in the control plates (C^- for cytotoxicity ; C^+ for anticytotoxicity assays) or the ratio between the number of plaques in the test plates and the number of plaques in the control plates (C^- for genotoxicity ; C^+ for antigenotoxicity assays) and expressed as mean (m) \pm standard deviation (sd). Statistical analysis was performed using one way analysis of variance (ANOVA), and then the multiple comparison test (Tukey) was applied to compare the differences between the means, considering the results significant when $p < 0.05$.

3. Results

The results obtained in the cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity evaluation of the *Celtis iguanaea* extract are presented in Tables 1 and 2. Mean (m) and

standard deviation (sd) of number of WP2s(λ) colonies (survival assessment) and number of plaques (assessment of lysogenic induction) in RJF013 cultures formed. Induction factor (IF) and survival fraction (SF) depending on the doses of *Celtis iguanaea* extract (CIE) (Table 1) and depending on the dose of CIE co-treated with MMC (0.5 μ g) (Table 2).

INSERT TABLE 1

The cytotoxicity evaluation expressed by the survival fraction (SF) allowed to observe that the extract did not cause a significant decrease in cell inactivation in any tested dose in relation to the negative control ($p > 0.05$). In fact, we observed an increase in the number of colonies in all CIE concentrations, being the highest CIE dose (5mg) also the highest increase in the number of colonies (SF = 1,28). The positive control (MMC) presented lesser rates of surviving colonies (SF= 0,011) in relation to all treated groups and the negative control. This result is expected, since mitomycin C is a well known cytotoxic agent (Estream and Vanleeuwen, 2000).

Regarding genotoxicity, the data expressed by the induction factor (IF) showed no significant increase in the number of plaques in any CIE dose when compared to the negative control ($p > 0.05$). Even in the highest concentration (5mg) the extract presented similar rate of prophage λ induction (IF = 1.10) compared to the negative control. The positive control (MMC) presented considerably greater lysogenic induction (IF = 12.55) in relation to the CIE doses and negative control. This value is expected, since mitomycin is described as a highly genotoxic and mutagenic agent (Kang *et al.*, 2006).

INSERT TABLE 2

As demonstrated in table 2, we observed an increase in the number of surviving cells at all tested doses ($p < 0.05$) in relation to the positive control, showing that the

extract attenuated the cytotoxic effects of MMC. The maximum increase in the number of survivors occurred at concentration of 1mg (SF = 10.54), while the 2,5 mg dose presented the lightest protective effect (SF = 8.54). However, it was not detected a significant difference among all tested doses ($p > 0.05$).

The antigenotoxicity evaluation showed that although all CIE doses co-treated with MMC had shown lower IF values than that of the alkylating agent MMC alone, the difference was not significant ($p > 0.05$). However, the anticytotoxic activity exerted by the CIE should be considered, because a higher number of viable bacteria would normally present higher lysogenic induction values.

4. Discussion

The present study aimed to assess the cytotoxicity, genotoxicity, anticytotoxicity and antigenotoxicity of *Celtis iguanaea* extract (CIE) by the prophage λ induction test, which is a manifestation of the SOS functions. It is presumed that the induction signal of the SOS functions in consequence to genotoxic agents must be single strand DNA generated by the attempt to replicate damaged templates or by the blockage of normal replication. These events are followed by the activation of the RecA protein. The phage induction phenomenon occurs due to the structural similarity between the prophage repressor CI and the bacterial LexA repressor, which enables their interaction with activated RecA. After CI cleavage, the bacterial genes responsible for the lytic cycle are expressed (Moreau, 1981). It is already known that the lysogenic induction measured by the SOS-Inductest also occurs as a response to many carcinogenic agents, such as germicidal UV radiation, alkylating compounds, agents that produce DNA cross-links, replication stoppage, among others, reflecting the level of bacterial DNA damage induction. (De Flora *et al.*, 2001; Ames, 1983)

Thus, this assay is able to evaluate the genotoxicity and antigenotoxicity of physical, chemical and biological agents. On the other hand, the bacterial survival assay is necessary to define basal cytotoxicity, allowing the observation of the intrinsic ability of a compound to cause cellular death as a consequence of damage to basic cellular functions (Einsenbrand *et al.*, 2002).

Our results in the present work demonstrated that the CIE did not provoke a decrease in cell survival in any tested dose. The absence of cytotoxicity is restated by the increase in the number of colonies as the extract concentration rises, with all CIE doses showing even higher SF values than the negative control. Regarding genotoxicity, the CIE did not induce an increase in the prophage λ induction, presenting in all concentrations similar IF values to those of basal lysogeny (spontaneous lysogenic induction).

The anticytotoxicity assessment of the CIE allowed to observe a significant protective effect when the extract is co-treated with MMC. The CIE attenuated the cytotoxic activity of the positive control in all tested doses, with a protective value around 10 times. The obtained data demonstrated that the CIE did not showed antigenotoxic activity. The extract was not able to decrease significantly the number of plaques formed in any tested concentration when compared to the alkylating agent MMC. However, it is important to note that all doses showed a small reduction compared to the genotoxic agent alone. Considering that the CIE exerted anticytotoxic activity allowing a larger number of living bacteria (around 10x), this small reduction of genotoxicity becomes more significant, since it has shown lower lysogenic induction values in a higher number of cells able to be induced.

The phytochemical analysis of the *Celtis iguanaea* leaves revealed the presence of coumarins, mucilage and flavonoids (De Paula, 2009).

Coumarins have a wide variety of bioactivities including anti-inflammatory, anticoagulant, antimicrobial, vasodilator, antihelminthic, sedative and hypnotic, analgesic, hypothermic and antitumor-promoting activity (Ojala, 2001; O’Kennedy and Thornes, 1997). According to Lake (1999), the majority of tests for mutagenic and genotoxic potential suggest that coumarins are not genotoxic agents, and exposure to coumarins from food, medicines and/or cosmetic products poses no health risk to humans. However, the possibility for phototoxic effects of coumarins furanoderivatives should be kept in mind (Edwards *et al.*, 1994).

Mucilage is used in medicine mainly as an emollient and a demulcent, but some mucilaginous plants have other applications, like Aloe Vera’s gel, that has been used since ancient times to treat burns and other wounds where it is thought to be able to enhance the healing rate and to reduce the infection risk (Choy and Chung, 2003).

Flavonoids have been recognized to possess anti-inflammatory, analgesic, antiallergic, hepatoprotective, anti-bacteria, antiviral, and anticarcinogenic activities (Hodek *et al.*, 2002), but probably the most prominent properties of the flavonoids are their radical scavenging and antioxidant abilities (Havsteen, 2002).

As we know, at least two distinct processes are responsible for the diverse biological effects exhibited by the mitomycins: DNA alkylation, and the generation of reactive free radicals such as superoxide and hydroxyl radicals, thereby inducing DNA strand scission. (Kang *et al.*, 2006) It is also known that antioxidant agents significantly reduce the cytotoxicity and genotoxicity of compounds which generate free radicals (Hallwell, 2002; Marnett, 2000). We suggest that the anticytotoxic and partial antigenotoxic effects of the CIE could be associated, at least partially, with the presence of flavonoids, exerting protective effects by scavenging reactive oxygen and/or other antioxidant mechanisms.

5. Conclusion

Our results demonstrated that the *Celtis iguanaea* aqueous leaves extract did not present cytotoxic and genotoxic activities, but showed significant anticytotoxic and partial antigenotoxic effects against MMC under the experimental conditions applied in this study.

6. Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de apoio à Pesquisa (FUNAPE - UFG) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

7. References

- AMES, BN., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science.*, v.221, n.4617, p.1256 -1264.
- AMES, BN., GOLD, LS., 1989. Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Environmental and Mol. Mutagenesis.*, v.14, n.16, p. 66 - 77.
- APG., 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II.; *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.141, p. 399 - 436.
- BERG, CC., DAHLBERG, SV., 2001. A revision of *Celtis* subg. *Mertensia* (Ulmaceae) *The Norwegian Arboretum/Botanical Institute, University of Bergen, N-5259 Hjelletstad, Norway*. *Brittonia* v.53, p.66 - 81.

- CARNEIRO, MRB., 2009. A flora medicinal no centro oeste do Brasil: Um estudo de caso com abordagem etnobotânica em Campo Limpo de Goiás. *Master's dissertation. Centro Univ. de Anápolis., UniEVANGÉLICA., Anápolis, GO.*
- CHEN, W., WENG, YM., TSENG, CY., 2003. Antioxidative and Antimutagenic Activities of Healthy Herbal Drinks from Chinese Medical Herbs. *The American Journal Of Chinese Medicine.*, v.31, n.4, p.523 - 532.
- CHOI, S., CHUNG, MH., 2003. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biological effects. *Semin Integr Med.*, v..1, p.53 – 62.
- DA SILVA, J., HEUSER, V., ANDRADE, V., 2003. Biomonitoramento Ambiental. In: DA SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, JAP., *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance, Porto Alegre, RS, p.167-178.
- DÉCIGA-CAMPOS, M., RIVERO-CRUZ, I., ARRIAGA-ALBA, M., CASTANEDA-CORRAL, G., ANGELES- LÓPEZ, GE., NAVARRETE, A., MATA, R., 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.*, v.110, p.334 - 342.
- DE FLORA, S., IZZOTTI, A., D'AGOSTINI, F., BALANSKY, R.M., NOONAN, D., ALBINI, A., 2001. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutat. Res.*, v.480 - 481, p.9 – 22.
- DE PAULA, MA., 2009. Caracterização Farmacognóstica e Estudo das Atividades Farmacológicas do Extrato Aquoso do Esporão de Galo (*Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent)., *Master's dissertation, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO*
- DJERIDANE, A., YOUSFI, M., NADJEMI, B., BOUTASSOUNA, D., STOCKER, P., VIDAL, N., 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds., *Food Chemistry.*, v.97, p.654 - 660.

- EDWARDS, SM., DONNELLY, TA., SAYRE, RM. and RHEINS, LA., 1994. Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity using a human skin model, *Skin2 TM. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, V.10, p.111 - 117.
- EINSENBAND, G., POOL-ZOBEL, B., BAKER, V., BALLS, M., BLAAUBOER, BJ., BOOBIS, A., CARERE, A.; KEVEKORDES, S., LHUGUENOT, JC., PIETERS, R., KLEINER, J., 2002. Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem., Toxicol.*, v.40, n.2-3, p.193 - 236.
- ESTREAM, SA., VANLEEUEWEN, RN., 2000. Use of mitomycin-C for maintaining myringotomy patency. *Otolaryngol.Head Neck Surg.*, v.122, n.1, p.8 -10.
- FEARON, ER.,VOLGELSTEIN, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell, Cambridge.*, v.61, p.759 - 767.
- FRIEDBERG, EC., Walker, GC., and SIEDE, W., 1995. DNA Repair and Mutagenesis. *Academic Press, New York*, 698 pp.
- HALLWELL, B., 2002. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker. *Free Radical Biology & Medicine.*, v.32, p.968 - 974.
- HAVSTEEN, BH., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics.*, v.96, p.67 - 202.
- HODEK, P., TREFIL, P., STIBOROVÁ, M., 2002. Flavonoids - potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions.*, v.139, p.1 - 21.
- KANG, YH., KYUNG-AE, L., RYU, CJ., LEE, H., LIM, J., PARK, SN., PAIK, S., YOON, D., 2006. Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells. *Cancer Lett.*, v.237, n.1, p. 33 - 44.

- LAKE, BG., 1999. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.*, v.37, n.4, p. 423 - 453.
- LIJINSKI, W., 1989. A view of the relation between carcinogenesis and mutagenesis. *Environmental and Mol. Mutagenesis.*, v. 4, n.16, p. 78 - 84.
- LITTLE, JW., 1991. Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie.*, v.73, p. 411 - 422.
- MARNETT, L., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.*, v.21, p. 361-370.
- MARQUES, RCP., MEDEIROS, SRB., DIAS, CS., BARBOSA-FILHO, JM., AGNEZ-LIMA, LF., 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutat. Res.*, v.536, n.1/2, p.117 - 120.
- MOHD-FUAT, AR., KOFI, EA., and ALLAN, GG., 2007. Mutagenic and cytotoxic properties of three herbal plants from South Asia. *Trop. Biomed.*, v.24, p. 49 - 59.
- MOREAU, P., BAILONE A., DEVORET, R., 1976. Prophage λ induction in *Escherichia coli* K-12 uvrA uvrB: A highly sensitive test for potential carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.73, p. 3700 - 3704.
- MOREAU, P. L., 1981. Mécanismes de la mutagénèse et de induction lisogénic. *Principe des tests bactériens pour la detection des cancérogènes et antitunoraux potentials.*, v.6, n.4.
- OJALA T., 2001. Biological Screening of Plant Coumarins. *Academic dissertation. Faculty of Science of the Helsinki University.*, HELSINKI.
- O'KENNEDY, R., and THORNES, RD., 1997. Coumarins – Biology, Applications and Mode of Action, Ed. John Wiley. 358 pp.

- PILIACKAS, VDD., PILIACKAS, JM., BARBOSA, LM., SILVA, JLJr., CANUTO, MH., 2001. Análise Etnobotânica das Plantas Mediciniais e sua Influência sobre o Ambiente da Cidade de Diamantina, Minas Gerais (MG), Brasil. *Publs. Avulsas do Instituto Pau Brasil.*, n.10, dez.
- RASKIN, I., RIBNICKY, DM., KOMARNYTSKY, S., ILIC, N., POULEV, A., BORISJUK, N., BRINKER, A., MORENO, D.A., RIPOLL, C., YAKOBY, N., O'NEAL, JM., CORNWELL, T., PASTOR, I., FRIDLENDER, B., 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology.*, v. 20, n. 12, p. 522 - 531.
- REBECCA, MA., ISHII-IWAMOTO, EL., GRESPAN, R., CUMAN, RKN., CAPARROZ-ASSEF, SM., MELLO, JCPDe., BERSANI-AMADO., 2002. Toxicological studies on *Stryphnodendron Adstringens*. *J. of Ethnopharmacology.*, v.83, p. 101 - 104.
- SATTARIAN, A., 2006. Contribution to the biosystematics of *Celtis* L. (Celtidaceae) with special emphasis on the African species., *PhD thesis, Wageningen University.*, Wageningen.
- SILVA, CSP., PROENÇA, CEB., 2008. Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. *Acta bot. bras.*, v.22, n.2, p. 481 - 492.
- SOUZA, V.C., LORENZI, H., 2005. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. *Instituto Plantarum, São Paulo: Nova Odessa.*, 640p.
- VENDRUSCOLO, GS., and MENTZ, LA., 2006. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela

comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.20, p. 367 - 382.

VERSCHA EVE, L., KESTENS, V., TAYLOR, JLS., ELGORASHI, EE., MAES, A., VAN PUYVELDE, L., KIMPE, N., VAN STADEN, J., 2004. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicol. In Vitro.*, v.18, n.1, p.29 - 35.

WALKER, GC., 1996. The SOS responses of *Escherichia coli*. In: CURTIS, R., INGRAHAM, JL., LIN, ECC., LOW, KB., MAGASANICK, B., REZNICOFF, WS., RILEY, M., SCHAECHTER, M., UMBARGER, HE., *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology.*, American Society for Microbiology, v.1, p. 1400 - 1416.

WALKER, GC., 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.*, v.48, n.1, p. 60 - 93.

Table1. Mean (m) and standard deviation (sd) of number of colonies (survival assessment) of *E. coli* WP2s(λ) and number of plaques (assessment of lysogenic induction) in RJF013 *E. coli* cultures formed after treatment with different doses of the *Celtis iguanaea* Aqueous Extract.

Treatment	m \pm sd (survival)	m \pm sd (induction)	SF	IF
Negative Control ¹	1.81 x 10 ⁸ \pm 0.14 x 10 ⁸	1.37 x 10 ⁶ \pm 0.15 x 10 ⁶	1.0 \blacklozenge	1.0 \bullet
0,5mg CIE	1.98 x 10 ⁸ \pm 0.25 x 10 ⁸	1.29 x 10 ⁶ \pm 0.13 x 10 ⁶	1.09 \blacklozenge	0.94 \bullet
1,0mg CIE	2.23 x 10 ⁸ \pm 0.54 x 10 ⁸	1.38 x 10 ⁶ \pm 0.13 x 10 ⁶	1.23 \blacklozenge	1.01 \bullet
2,5mg CIE	2.22 x 10 ⁸ \pm 0.64 x 10 ⁸	1.41 x 10 ⁶ \pm 0.28 x 10 ⁶	1.22 \blacklozenge	1.03 \bullet
5,0mg CIE	2.33 x 10 ⁸ \pm 0.81 x 10 ⁸	1.51 x 10 ⁶ \pm 0.24 x 10 ⁶	1.28 \blacklozenge	1.10 \bullet
Positive Control ²	2.09 x 10 ⁶ \pm 0.17 x 10 ⁶	1.72 x 10 ⁷ \pm 0.12 x 10 ⁷	0.011*	12.55 \oplus

¹ Sterile distilled water; ² 0,5 μ g of mitomycin C; CIE: *Celtis iguanaea* aqueous extract.

Same symbols in the same column ($p > 0.05$)

Different symbols in the same column ($p < 0.05$)

Table2. Mean (m) and standard deviation (sd) of number of colonies (survival assessment) of *E. coli* WP2s(λ) and number of plaques (assessment of lysogenic induction) in RJF013 *E. coli* cultures formed after simultaneous treatment with different doses of *Celtis iguanaea* and MMC.

Treatment	m \pm sd (survival)	m \pm sd (induction)	SF	IF
Positive Control ¹	4.20 x 10 ⁶ \pm 0.33 x 10 ⁶	3.71 x 10 ⁷ \pm 0.57 x 10 ⁷	1.0 \oplus	1.0 *
0,5mg CIE + MMC	3.65 x 10 ⁷ \pm 0.48 x 10 ⁷	3.16 x 10 ⁷ \pm 0.45 x 10 ⁷	8.69 \blacklozenge	0.85 *
1,0mg CIE + MMC	4.43 x 10 ⁷ \pm 0.62 x 10 ⁷	3.28 x 10 ⁷ \pm 0.38 x 10 ⁷	10.54 \blacklozenge	0.88 *
2,5mg CIE + MMC	3.59 x 10 ⁷ \pm 0.88 x 10 ⁷	3.51 x 10 ⁷ \pm 0.48 x 10 ⁷	8.54 \blacklozenge	0.94 *
5,0mg CIE + MMC	4.16 x 10 ⁷ \pm 0.64 x 10 ⁷	3.23 x 10 ⁷ \pm 0.47 x 10 ⁷	9.90 \blacklozenge	0.87 *
Negative Control ²	3.74 x 10 ⁸ \pm 0.48 x 10 ⁸	3.13 x 10 ⁶ \pm 0.45 x 10 ⁶	89.04 \bullet	0.08 \clubsuit

¹0,5 μ g of mitomycin C; ²Sterile distilled water; CIE: *Celtis iguanaea* extract.

Same symbols in the same column ($p > 0.05$)

Different symbols in the same column ($p < 0.05$)

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E
ANTIGENOTÓXICA DE *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent PELO
TESTE DO MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE
CAMUNDONGOS**

FLAVIO FERNANDES VELOSO BORGES

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Geral

Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese

Assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent by micronucleus test in mice bone marrow

Borges, Flavio Fernandes Veloso^a, Machado, Thiago Chaves^a, Cunha, Kênya Silva^b, Pereira, Karla de Castro^b, Costa, Elson Alves^c, Paula, José Realino^d and Chen-Chen, Lee^{a*}

^a*Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus-II, Goiânia, GO, Brazil*

^b*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus-II, Goiânia, GO, Brazil*

^c*Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus-II, Goiânia, GO, Brazil*

^d*Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil*

Keywords: Celtis iguanaea, cytotoxic, genotoxic, antigenotoxic, micronucleus, mice

** Corresponding author:*

Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, P.O. Box nº 131, Campus-II, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil

Tel.: + 55-62-3521-1483; fax: + 55-62-3521-1190

E-mail address: chenleego@yahoo.com.br

ABSTRACT

Celtis iguanaea (Jacq.) Sargent is a member of the Cannabaceae family and popularly known as “esporão de galo” in Brazil. Ethnobotanical surveys of cerrado native plants show that the tea leaves of *C. iguanaea* are used in folk’s medicine for body aches, asthma, cramps, poor digestion, urinary infections, kidney disfunctions, as a stimulant or as a diuretic. The purpose of the present work was to evaluate the possible cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects of the *C. iguanaea* aqueous leaves extract (CIE) using the micronucleous test in mice bone marrow. To assess the genotoxic activity, Swiss mice were orally treated with three different extract concentrations (100, 300 and 500 mg/kg). To evaluate the antigenotoxic activity, the same doses of extract were used simultaneously with a single dose i.p. of mitomycin C (MMC, 4mg/Kg). The frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) were evaluated at 24 and 48 h exposure period except the negative control (24h). Genotoxicity was evaluated by using the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE), whereas cytotoxicity was assessed by the polychromatic and normochromatic erythrocytes ratio (PCE/NCE). The results of the genotoxic evaluation have shown that none of the extract doses had increased significantly the frequency of MNPCE when compared to the negative control ($p > 0.05$). The results of the cytotoxic assessment have shown that the CIE did not reduce significantly the PCE/NCE ratio compared to the negative control ($p > 0.05$). The antigenotoxic evaluation results demonstrated that CIE had reduced significantly the frequency of MNPCE compared to the positive control ($p < 0.05$). The cytotoxicity caused by MMC was significantly attenuated ($p < 0.05$) at all CIE concentrations used. Our results demonstrated that the CIE showed no cytotoxic and genotoxic effects. Nevertheless, it showed antigenotoxic and anticytotoxic actions.

1. Introduction

The use of plant products for the treatment, cure and prevention of general disorders is one of the earliest forms of medical practice, and probably almost as old as the human species.¹ It is estimated that natural products and herbal preparations are responsible for 25% of the medical prescriptions in developed countries and about 80% in developing countries.²

The Brazilian Cerrado is the richest savanna formation in the world, responsible for about 5% of global biodiversity, and considered one of the world's hotspots,³⁻⁴ with an endemic level of 44% for vascular plants and 70% for herbaceous plants, representing a valuable spectrum of organic molecules with medical and therapeutic potential that is, unfortunately, still minimally explored.⁵

In Brazilian Savannah traditional medicine, the plant *Celtis iguanaea* (Jacq) Sargent popularly known as “esporão-de-galo”,⁶ is used as leaves infusion for treatment of body pains, asthma, colic, poor digestion, urinary infections, kidney disfunctions, as stimulant and as a diuretic.⁷⁻⁹ According to ethnobotanical surveys of cerrado native plants, *Celtis iguanaea* showed a considerable consensus of popular usage,⁸ which may indicate potential medical properties and strengthen the need of proper pharmacological and toxicological studies.¹⁰ However, despite the wide use of this plant, it has a rather scarce literature, and few information regarding the biological effects of its constituents, especially when it comes to their potential toxicological properties.

Studies regarding phytotherapies already reported that many medicinal plant compounds have demonstrated undesirable properties, such as mutagenicity, carcinogenicity and toxicity, limiting in this manner, their use as therapeutic agents.¹¹⁻¹² In the other hand, studies also showed that phytotherapies could possess antigenotoxic/anticarcinogenic effects.¹³⁻¹⁵ In this way, the investigation of traditionally

used medicinal plants is valuable both as a source of potential chemotherapeutic drugs, and as a measure of safety for the continued use by the population.¹⁶

Short-term assays have been used for more than 30 years to identify chemical, physical, and biological genotoxic agents, as well as to assess their carcinogenic potential. Although the genetic toxicity is not a direct measure of carcinogenicity, it is often used as an indicator for cancer, since the genotoxicity tests measure an initial or intermediary event in tumorigenesis.¹⁷

Among the methods for *in vivo* genotoxicity investigation, the micronucleus test has been widely accepted by regulatory agencies and government institutions.¹⁸⁻¹⁹ This assay was initially developed in mouse bone marrow erythrocytes,²⁰ and since then it has been used to assess the genotoxic potential of physical and chemical agents,²¹⁻²² in the biomonitoring of human populations occupationally exposed to mutagens,²³⁻²⁴ in the search for carcinogenesis inhibiting compounds²⁵⁻²⁶ and ecotoxicological studies.²⁷⁻²⁸ The micronucleus test detects genetic alterations arising from chromosomal damage and/or damage to the mitotic apparatus caused by clastogenic or aneugenic agents, respectively. As micronuclei (MN) are indicative of irreversible DNA loss, their frequency may be used as a mutation index.²⁹ It is already known that there is a positive correlation between increased frequency of MN and the appearance of tumors in rodents and humans.²⁹⁻³⁰

Thus, considering the widespread use of this plant by the Brazilian people, the present work aimed at evaluating the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* aqueous leaves extract (CIE) using the *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test.

2. Material and Methods

2.1 Plant Material: *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent extract

The leaves of “esporão de galo” (*Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent) were collected in riparian forest, municipality of Campestre - Goiás, Brazil. The botanical material was identified and a voucher specimen deposited in the Herbarium of the Universidade Federal de Goiás, Goiânia (GO) under the number 40110/UFG. The *Celtis iguanaea* aqueous extract (CIE) was extracted and concentrated by the following procedure: The leaves were dried in an oven at 40°C with forced ventilation and then ground into a powder. The CIE was obtained by infusion of the powder 3% at a temperature of 80°C for 30 min, with agitation every 10 min. After vacuum filtration the filtrate was concentrated under reduced pressure at a temperature of 45°C. The yield of the extract was determined by the dry weight method (20%), and the final concentration was 60 mg/ml. The CIE solutions were always prepared immediately before their use in the experiments.

2.2. Animals

This study was approved by the Human and Animal Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Goiás (CEPMHA/HC/UFG n° 014/09) Healthy young male adults (8 - 12 weeks) *Mus musculus* - Swiss Webster out bred mice, weighing 30 - 40g, obtained from the Central Animal Facility of Federal University of Goiás (Goiás, Brazil) were randomly allocated to treated groups. All animals were brought to the laboratory 7 days before the experiments and housed in polyethylene cages (40cm x 30cm x 16 cm), in groups of five animals, lined with wood shavings, in air conditioned

rooms at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $50 \pm 10\%$ relative humidity, with a 12-h light/dark natural cycle. Food (appropriate commercial rodent diet Labina, Ecibra Ltda) and water were given *ad libitum*.

2.3 Experimental procedure

To evaluate the genotoxicity of the extract, five animal groups were orally treated with three different doses (100, 300 and 500 mg/kg) of CIE. A positive (4 mg/kg i.p. mitomycin C, $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$, Bristol-Myers Squibb) and a negative control group (sterile distilled water) were included. In order to assess antigenotoxicity, the same CIE doses were administered simultaneously with a single i.p. dose of MMC (4 mg/kg). All treatments were evaluated at 24 and 48 h exposure period except the negative control (24h). The animals were euthanized by cervical dislocation, femurs were dissected, opened and the bone marrow was gently flushed out using fetal calf serum (Soralli). After homogenization of the bone marrow in serum, it was centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. Then, the bone marrow cells were smeared on glass slides, coded for blind analysis, air-dried and fixed with absolute methanol (CH_4O , LabSynth) for five minutes. The smears were stained with Giemsa (Doles), dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich Chem, Co.), and monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich Chem. Co.) to detect micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE). For each mouse, three slides were prepared and a minimum of 2,000 polychromatic erythrocytes (PCE) were counted to determine the frequency of MNPCE. To evaluate CIE cytotoxicity, 1000 normochromatic erythrocytes (NCE) were counted, as well as the frequency of polychromatic erythrocytes (PCE) within the same microscope fields, and the PCE/NCE ratio was then calculated to measure bone marrow

toxicity. The slides were analyzed by microscopy (Olympus BH-2 10x100). The micronucleus test and MNPCE scoring were carried out according to²⁰.

2.4 Statistical analysis

To evaluate the genotoxic activity of the CIE, the frequency of MNPCE in the treated groups was compared to the results of the negative control group (genotoxicity assessment) or the results from the positive control group (antigenotoxicity evaluation), using one way analysis of variance (ANOVA), followed by the multiple comparison test (Tukey). P values lower than 0.05 ($p < 0.05$) were considered indicative of statistical significance. In order to assess the CIE cytotoxicity, the polychromatic/normochromatic erythrocytes ratio (PCE/NCE) of all treated groups was compared to the result of the negative control group (cytotoxicity assessment) or the result from the positive control group (anticytotoxicity evaluation), using qui-square test (χ^2). A value of $p < 0.05$ was taken as the criterion of statistical significance.

3. Results

Table 1 summarizes the frequencies of MNPCE and PCE/NCE ratio in mice bone marrow cells treated with *C. iguanaea* extract.

INSERT TABLE 1

The results obtained showed no significant increase in MNPCE frequency either 24h (4.6, 5.0, 5.4) or 48h (4.8, 5.4, 4.8) after the administration of CIE at any tested dose (100, 300, 500 mg/kg) when compared to the negative control ($p > 0.05$). There was significant increase of MNPCE frequency at the positive control group compared to

the negative control group ($p < 0.05$). This result is expected, since MMC is described as a highly genotoxic and mutagenic agent.³¹

Regarding cytotoxicity, no significant decrease in the PCE/NCE ratio was observed when comparing mice treated with CIE and the negative control group for all tested doses and different times of evaluation ($p > 0.05$). As expected, the PCE/NCE value of MMC was much lower compared to the negative control or CIE doses, confirming its well known cytotoxic activity.³²⁻³³

Table 2 summarizes the frequency of MNPCE and PCE/NCE ratio in mice bone marrow cells treated simultaneously with different doses of *C. iguanaea* extract and 4.0 mg/kg of MMC.

INSERT TABLE 2

The results of the antigenotoxicity evaluation showed that CIE significantly decreased the MNPCE frequency either 24h (24.0, 22.2, 20.0) or 48h (9.60, 8.40, 8.20) after the administration of any of the three tested doses (100, 300, 500 mg/Kg co-treated with MMC) compared to the positive control ($p < 0.05$). The negative control group was statistically different compared to the positive control group ($p < 0.05$).

In relation to the anticytotoxic assessment of CIE, we observed an attenuation of the cytotoxic action provoked by MMC at all tested doses, either 24h or 48h exposure when compared to the respective positive control ($p < 0.05$).

4. Discussion

In the present study, we aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* extract using the mice bone marrow micronucleus test. This short term assay is recommended by regulatory agencies all

over the world as the first *in vivo* test to be conducted in chemical safety analysis.³⁴ It has proven to be a reliable method to investigate the genotoxic (clastogenic and/or aneugenic) effects of chemical and physical agents.³⁵⁻³⁶

Micronuclei (MN) appear in erythrocytes due to damage induced in parental cells.³⁷ These small masses of chromatin are originated from acentric fragments or lagging chromosomes that fail to incorporate into either of the daughter nuclei during telophase of the mitotic cells. The MN frequency in polychromatic erythrocytes (PCE) of mouse bone marrow is a very sensitive index of damage,³⁸⁻³⁹ being induced by oxidative stress, exposure to clastogenic or aneugenic agents, genetic defects in cell cycle checkpoints and/or DNA repair genes and also by the deficiency of nutrients required as co-factors in DNA metabolism and chromosome segregation machinery.⁴⁰ All of these events that cause MN formation are associated with the chromosomal instability commonly observed in cancer.⁴¹⁻⁴³

Our results in the present work demonstrated that the *Celtis iguanaea* extract (CIE) did not provoke a significant increase in MNPCE frequency when compared to the negative control for all tested doses and treatment times. These results indicated that CIE did not exhibit genotoxic effects in PCE of the mice bone marrow.

The micronucleus assay also detects cytotoxic effects by the PCE/NCE ratio. When normal proliferation of bone marrow cells is affected by a toxic agent, there is a decrease in the number of immature erythrocytes (PCE) in relation to the number of mature erythrocytes (NCE), reflecting the bone marrow toxicity and cell depression.⁴⁴

Our results showed no significant reduction of PCE/NCE ratio in any CIE doses and treatment times applied compared to the negative control. Therefore, the results indicated that CIE did not present cytotoxic action.

The results of the antigenotoxicity evaluation (CIE + MMC) showed that the CIE reduced significantly the frequency of MMC-induced MNPCE in all extract concentrations and treatment times, attenuating, in this way, the genotoxic activity of the alkylating agent.

In relation to the anticytotoxic activity of CIE, we observed an attenuation of MMC cytotoxic action for all CIE doses and times tested.

The phytochemical analysis of the *Celtis iguanaea* leaves revealed the presence of coumarins, mucilage and flavonoids.⁴⁵

Coumarins present a wide variety of bioactivities including anti-inflammatory, anticoagulant, antimicrobial, vasodilator, antihelminthic, sedative and hypnotic, analgesic, hypothermic and antitumor-promoting activity.⁴⁶⁻⁴⁹ The majority of tests for mutagenic and genotoxic potential suggest that coumarins are not genotoxic agents, and exposure to coumarins from food, medicines and/or cosmetic products poses no health risk to humans.⁵⁰ However, the possibility for phototoxic effects of coumarins furanoderivatives should be kept in mind.⁵¹

Mucilage is used in medicine mainly as an emollient and a demulcent, but some mucilaginous plants have other applications, like Aloe Vera's gel, that has been used since ancient times to treat burns and other wounds, being able to enhance the healing rate and to reduce the infection risk.⁵²⁻⁵³

Flavonoids have been recognized to possess anti-inflammatory, analgesic, antiallergic, hepatoprotective, anti-bacteria, antiviral, and anticarcinogenic activities.⁵⁴⁻
⁵⁵ Although the mechanism by which many flavonoids protect against DNA damage and potentially against carcinogenesis is largely unknown, it is suggested that they may act as antioxidant, free radical scavengers, inhibitors of tumor cell growth, inducers of apoptosis, modulators of DNA repair or carcinogen inactivators.⁵⁶⁻⁵⁷

As we know, antioxidant agents significantly reduce the cytotoxicity and genotoxicity of compounds which generate free radicals.⁵⁸⁻⁶⁰ It is also known that the hazardous effect of MMC is related to its ability to alkylate DNA and produce reactive free radicals, which causes different types of cellular damage, including DNA breaks.³¹ In this way, the antigenotoxic and anticytotoxic activities of CIE detected in our experiments can be associated, at least partially, by the presence of flavonoids, exerting protective effects by scavenging reactive oxygen, reducing alkylation and/or other antioxidant mechanisms. However, the complexity of plant extracts cannot be overlooked, as the final response of a treatment using them is likely to be the result of synergistic, antagonistic, and other interactive effects among their biologically active components.

5. Conclusion

Our results in the present work indicate that the *Celtis iguanaea* aqueous leaves extract did not exhibit genotoxic or cytotoxic effects in mice bone marrow micronucleus test. Nonetheless, the extract showed antigenotoxic and anticytotoxic effects of this plant in our experimental conditions.

6. Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de apoio à Pesquisa (FUNAPE - UFG) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

7. Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

8. References

[1] Halberstein RA: Medicinal Plants: Historical and Cross-cultural usage patterns. *Ann Epidemiol* 2005; 15:686-699

[2] Almeida MG: Cultura ecológica e biodiversidade. *Mercator - Revista de Geografia da UFC* 2003; 3:71-82.

[3] Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal: Biodiversidade Brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. MMA/SBF 2002; Biodiversidade 5.

[4] Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J: Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000; 403:853-858.

[5] Machado RB, Aguiar LMS, Castro AJF, Nogueira C: Caracterização da fauna e flora do Cerrado. XI Simpósio Nacional sobre o Cerrado e o II Simpósio Internacional sobre Savanas Tropicais 2008; Brasília, DF.

[6] Souza VC, Lorenzi H: Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum 2005; 640p.

[7] Carneiro MRB: A flora medicinal no centro oeste do Brasil: Um estudo de caso com abordagem etnobotânica em Campo Limpo de Goiás. Master's Dissertation 2009; UniEVANGÉLICA, Anápolis,GO.

[8] Silva CSP, Proença CEB: Uso e disponibilidade de recursos medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. Acta bot Bras 2008; 22(2):481-492.

[9] Piliackas VDD, Piliackas JM, Barbosa LM, Silva JLLJr, Canuto MH: Análise Etnobotânica das Plantas Medicinais e sua Influência sobre o Ambiente da Cidade de Diamantina, Minas Gerais (MG), Brasil. Publs Avulsas do Instituto Pau Brasil 2001; n.10, dez.

[10] Vendruscolo GS, Mentz LA: Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. Acta Bot Bras 2006; 20:367-382.

[11] Marques RCP, Medeiros SRB, Dias CS, Barbosa-Filho JM, Agnez-Lima LF: Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. Mutat Res 2003; 536:117-120.

[12] Simoes CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. UFRGS / Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianopolis, 2001; 821p

[13] Aruoma O: Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutat Res 2003; 523-524:9-20.

[14] Gupta S, Chaudhuri T, Ganguly DK, Giri AK: Anticlastogenic effects of black tea (World blend) and its two active polyphenols theaflavins and thearubigins in vivo in Swiss albino mice. *Life Sci* 2001; 23:2735–2744.

[15] Waters MD, Stack HF, Jackson MA, Brockman HE, De Flora S: Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. *Mutat Res* 1996; 350:109–129.

[16] Verschaeve L, Kestens V, Taylor JLS, Elgorashi EE, Maes A, Van Puyelde L, Kimpe N, Van Staden J: Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicol In Vitro* 2004; 18:29-35.

[17] Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* Cambridge 1990; 61:759-767.

[18] Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M: Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006; 88:515-1531.

[19] Choy WN: Regulatory Genetic toxicology tests. In: Choy WN: *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. New York 2001; p.93-113.

[20] Schmid W: The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31:9-15.

[21] Ding GR, Nakahara T, Miyakoshi J: Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. *Mutagenesis* 2003; 18:439-443.

[22] Chung HW, Kang SJ, Kim SY: A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. *Mutat Res* 2002; 516:49-56.

[23] Bolognesi C, Landini E, Perrone E, Roggieri P: Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. *Mutat Res* 2004; 557:109-117.

[24] Majer BJ, Laky B, Knasmuller S, Kassie F: Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res* 2001; 489:147-172.

[25] Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, Bhattacharya RK, Siddiqi M: Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat Res* 2003; 523-524:33-41.

[26] Izzotti, A, Balansky RM, Dagostini F, Bennicelli C, Myers SR, Grubbs CJ, Lubet RA, Kelloff GJ, De Flora S: Modulation of biomarkers by chemopreventive agents in smoke-exposed rats. *Cancer Res* 2001; 61:2472-2479.

[27] Lorente MT, Martos A, Castano A: Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. *Ecotoxicology* 2002; 11:27-34.

[28] Gauthier JM, Dubeau H, Rassart É, Jarman WM, Wells RS: Biomarkers of DNA damage in marine mammals. *Mutat Res* 1999; 444:427-439.

[29] Azevedo L, Gomes JC, Stringheta PC, Gontijo AM, Padovani CR, Ribeiro LR, Salvadori DMF: Black bean (*Phaseolus vulgaris L.*) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food and Chemical Toxicology* 2003; 41:1671-1671.

[30] Valadares MC, Castro NC, Cunha LC: *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 43:631-638.

[31] Kang YH, Kyung-Ae L, Ryu CJ, Lee H, Lim J, Park SN, Paik S, Yoon D: Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells. *Cancer Lett* 2006; 237:33-44.

[32] Estream SA, Vanleeuwen RN: Use of mitomycin-C for maintaining myringotomy patency. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122:8-10.

[33] Kraut A, Drnovsek-Olup B: Instillation of mitomycin c after recurrent pterygium surgery. *Eur J Ophthalmol* 1996; 6:264-267.

[34] Khrishna G, Hayashi M: *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 2000; 455:155-199.

[35] Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate-Junior M: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res* 1990; 245:245–249.

[36] Schmid W: The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A: *Chemical mutagens: Principles and methods for their Detection* 1976; 4:31-53.

[37] Ribeiro LR: Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK: *Mutagênese ambiental* 2003; 356p.

[38] Suzuki Y, Takagi R, Kawasaki I, Matsudaira T, Yanagisawa H, Shimizu H: The micronucleus test and erythropoiesis: effects of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) on micronucleus formation. *Mutat Res* 2008; 655:47-51.

[39] Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R: Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese – Métodos e Critérios de Avaliação. *Revista Brasileira de Genética* 1991; 246p.

[40] Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti P, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Gordana J, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi M, Zijno A, Norppa H, Fenech M: An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007; 28:625-631.

[41] Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C: Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 2004; 428:77-81.

[42] Fenech M: Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology* 2002; 181-182:411-416.

[43] Ames BN, Wakimoto P: Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2:694-704.

[44] Shahrin Z, Baharuddin PJNM, Yahya A, Muhammad H, Bakar RA, ISMAIL Z: The in vivo rodent micronucleus assay of kacip fatimah (*Labisia pumila*) extract. *Trop Biomed* 2006; 23:214-219.

[45] De Paula MA: Caracterização Farmacognóstica e Estudo das Atividades Farmacológicas do Extrato Aquoso do Esporão de Galo (*Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent). Master's Dissertation 2009; Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

[46] Garcia-Argaez AN, Apan TOR, Delgado HP, Velazquez G, Martinez-Vazquez M: Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. *Planta Med* 2000; 66:279-281.

[47] Fujioka T, Furumi K, Fujii H, Okabe H, Mihashi K, Nakano Y, Matsunaga H, Katano M, Mori M: Antiproliferative constituents from umbelliferae plants. A new furanocoumarin and falcarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. Chem Pharm Bull 1999; 47:96-100.

[48] O'Kennedy R, Thornes RD: Coumarins – Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley & Sons Ltd.1997; 358p.

[49] Mizuno A, Takata M, Okada Y, Okumaya T, Nishino H, Nishino A, Takayasu J, Iwashima A: Structures of new coumarins and anti-tumor-promoting activity of coumarins from *Angelica edulis*. Planta Med 1994; 60:333-336.

[50] Lake BG: Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. Food and Chemical Toxicology 1999; 37:423-453.

[51] Edwards SM, Donnelly TA, Sayre RM, Rheins LA: Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity using a human skin model, Skin2 TM. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1994; 10:111-117.

[52] Choy S, Chung MH: A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biological effects. Semin Integr Med 2003; 1:53-62.

[53] Capasso F, Borrelli F, Capasso R, Di Carlo G, Izzo AA, Pinto L, Mascolo N, Castaldo S, Longo R: *Aloe* and its therapeutic use. Phytother Res 1998; 12: 124-127.

[54] Almassy Júnior AA, Lopes RC, Armond C, Silva F, Casali VWD: Folhas de chá - Plantas medicinais na terapêutica humana. Ed. UFV, Viçosa 2005; 233p.

[55] Hodek P, Trefil P, Stiborova M: Flavonoids - potent and versatile biologically

active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* 2002; 139:1–21.

[56] Lee JC, Kim J, Park JK, Chung GH, Jang YS: The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Experim Cell Research* 2003; 291:386-397.

[57] Duthie SJ, Dobson VL: Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 1999; 38:28-34.

[58] Borek C: Antioxidants and the prevention of hormonally regulated cancer.; *Journal of Men's Health & Gender* 2005; 2:346-352.

[59] Hallwell B: Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 32:968-974.

[60] Marnett L: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21:361-370.

Table1. MNPCE frequencies and PCE/NCE ratio in mice bone marrow treated with *Celtis iguanaea* aqueous extract at different doses and times.

Treatment (mg/kg)	Time (hours)	MN/2000 PCE					PCE/NCE Ratio	
		Individual data						Mean \pm SD
Negative Control ¹	24	5	4	6	4	4	4.60 \pm 0.89 •	1.13 \pm 0.10 ■
Positive Control ²	24	36	29	34	31	33	32.60 \pm 2.70*	0.51 \pm 0.04⊕
	48	14	12	11	11	15	12.60 \pm 1.81 ♦	0.39 \pm 0.03 ♣
CIE								
100 mg/Kg	24	4	7	3	4	5	4.60 \pm 1.51 •	1.22 \pm 0.08 ■
300 mg/Kg	24	5	5	6	4	5	5.00 \pm 0.70 •	1.08 \pm 0.04 ■
500 mg/Kg	24	7	4	4	6	6	5.40 \pm 1.34 •	1.18 \pm 0.07 ■
100 mg/Kg	48	3	6	4	5	6	4.80 \pm 1.30 •	1,13 \pm 0.05 ■
300 mg/Kg	48	6	7	4	7	3	5.40 \pm 1.81 •	1,16 \pm 0.07 ■
500 mg/Kg	48	5	3	4	5	7	4.80 \pm 1.48 •	1,27 \pm 0.15 ■

¹ Sterile distilled water; ² Mitomycin C (4 mg/kg); CIE: *Celtis iguanaea* extract.

The CIE doses are compared to their respective positive controls in the same exposition times.

Same symbols in the same column ($p > 0.05$)

Different symbols in the same column ($p < 0.05$)

Table 2. MNPCE frequencies and PCE/NCE ratio after simultaneous treatment with *Celtis iguanaea* extract and MMC.

Treatment (mg/kg)	Time (hours)	MN/2000 PCE					Mean \pm SD	PCE/NCE Ratio
		Individual data						
Negative Control ¹	24	5	4	6	4	4	4.60 \pm 0.89 \blacklozenge	1.13 \pm 0.10 \bullet
Positive Control ²	24	36	29	34	31	33	32.60 \pm 2.70 *	0.51 \pm 0.04*
	48	14	12	11	11	15	12.60 \pm 1.81 \clubsuit	0.39 \pm 0.03 \clubsuit
CIE								
100 mg/Kg + MMC	24	24	26	27	21	22	24.0 \pm 2.54 \bullet	0.64 \pm 0.07 \blacklozenge
300 mg/Kg + MMC	24	21	21	25	24	20	22.2 \pm 2.16 \bullet	0.71 \pm 0.09 \blacklozenge
500 mg/Kg + MMC	24	23	20	19	20	18	20.0 \pm 1.87 \bullet	0.69 \pm 0.06 \blacklozenge
100 mg/Kg + MMC	48	10	8	9	11	10	9.60 \pm 1.14 \ominus	0.58 \pm 0.07 \oplus
300 mg/Kg + MMC	48	9	8	8	9	8	8.40 \pm 0.54 \ominus	0.55 \pm 0.06 \oplus
500 mg/Kg + MMC	48	8	7	10	7	9	8.20 \pm 1.30 \ominus	0.62 \pm 0.04 \oplus

¹ Sterile distilled water; ² mitomycin C (4 mg/kg); CIE: *Celtis iguanaea* extract.

The CIE doses are compared to their respective positive controls in the same exposition times.

Same symbols in the same column ($p > 0.05$)

Different symbols in the same column ($p < 0.05$)

6 - CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Considerando os objetivos propostos e de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pôde-se concluir que o extrato aquoso das folhas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent (esporão de galo) nas condições experimentais realizadas:

- ❖ Apresentou ausência de atividade citotóxica e genotóxica pelo Induteste SOS em cepas de *Escherichia coli*, não provocando uma diminuição considerável no número de colônias sobreviventes ou aumento dos plaques formados.
- ❖ Apresentou atividade anticitotóxica e uma parcial antigenotoxicidade pelo Induteste SOS, atenuando a inativação celular e a indução lisogênica provocadas pela MMC.
- ❖ Apresentou ausência de ação citotóxica e genotóxica pelo Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos *in vivo*, não acarretando uma redução significativa na relação EPC/ENC e nem um aumento considerável na freqüência de EPCMN.
- ❖ Apresentou ação anticitotóxica e antigenotóxica pelo Teste do Micronúcleo, reduzindo a toxicidade na medula óssea (aumento na razão EPC/ENC) e a incidência de micronúcleos induzidos pela MMC.

Estudos sobre a segurança e toxicidade de plantas utilizadas na terapêutica são de vital importância. Neste contexto, realizamos a avaliação do perfil toxicológico do extrato das folhas de “esporão de galo” (*Celtis iguanaea*) devido à sua considerável gama de aplicações como fitoterápico e seu difundido uso na medicina popular. Sugerimos que as atividades biológicas apresentadas pelo extrato no presente trabalho possam estar associadas, pelo menos parcialmente, com a presença de flavonóides, exercendo seu efeito protetor através do sequestro de espécies reativas de oxigênio e/ou outros mecanismos antioxidantes. Os resultados obtidos incentivam uma investigação mais minuciosa do extrato, para melhor caracterizar suas atividades antigenotóxica e anticitotóxica, assim como para identificar seus compostos ativos e seus mecanismos de ação.

7 - ANEXOS

7.1 Gráficos dos resultados obtidos no Induteste SOS

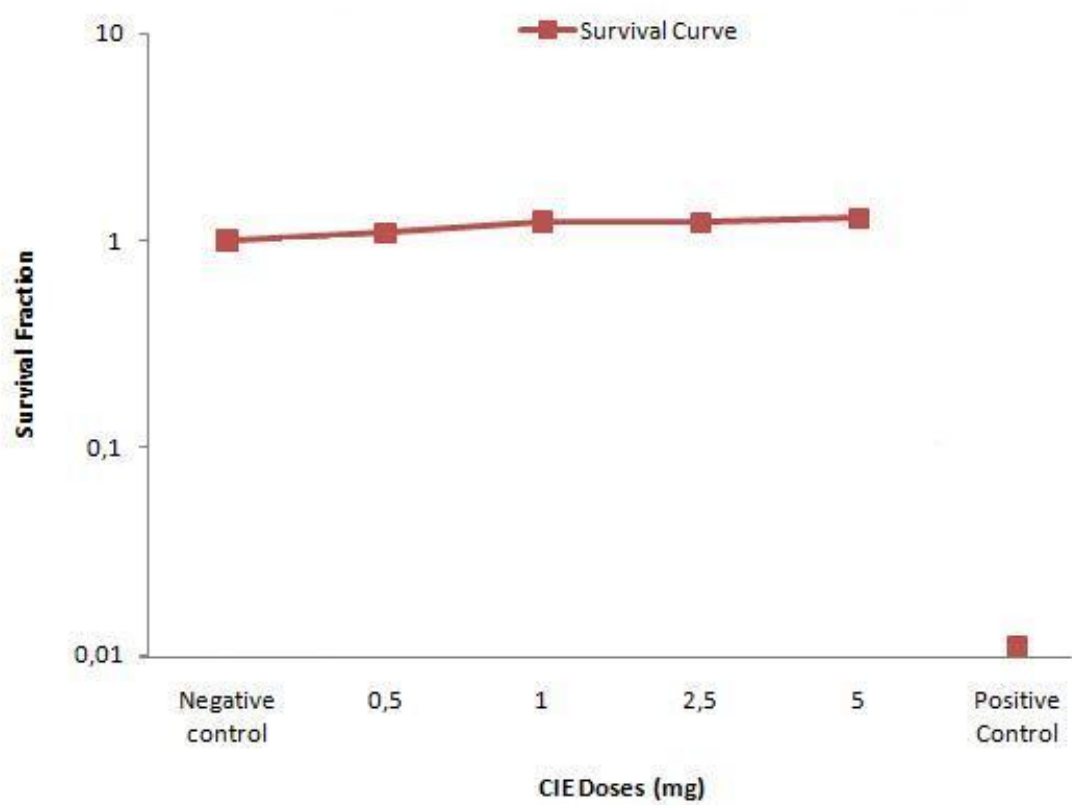


Figure 12 - Survival fraction of the WP2s(λ) strain in relation to the CIE dose.

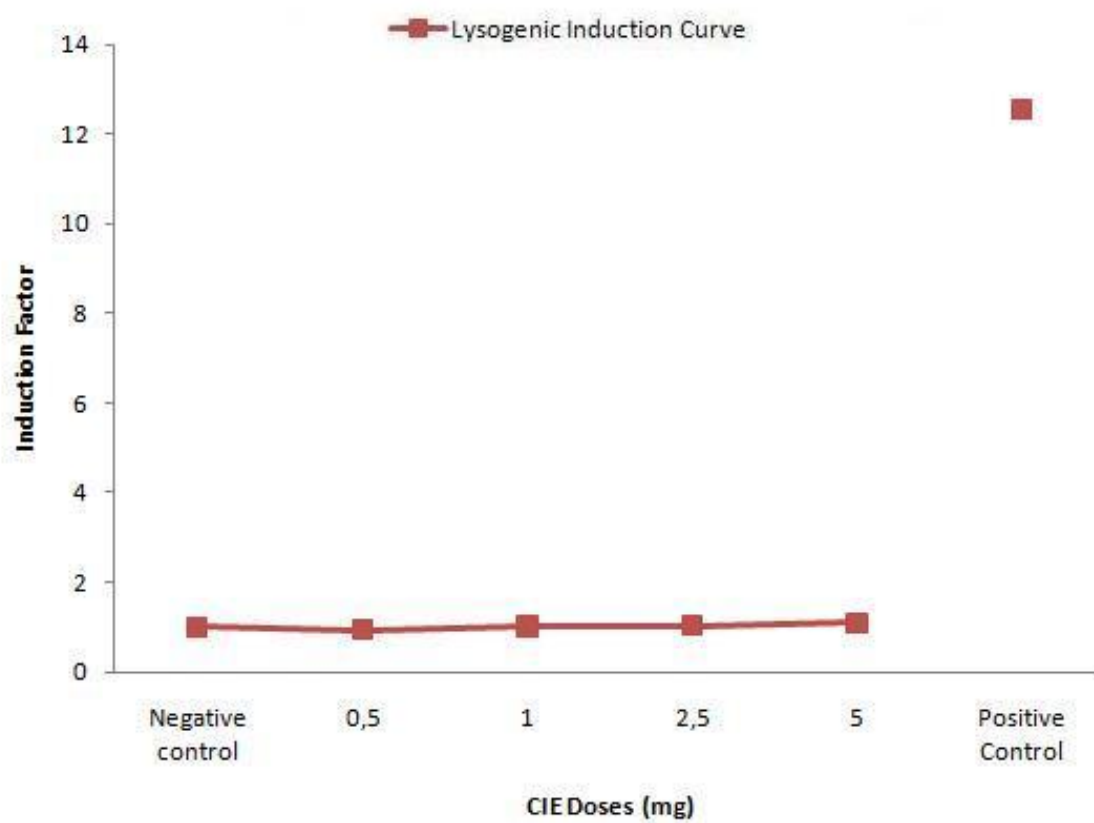


Figure 13 - Induction Factor of the WP2s(λ) strain in relation to the CIE dose.

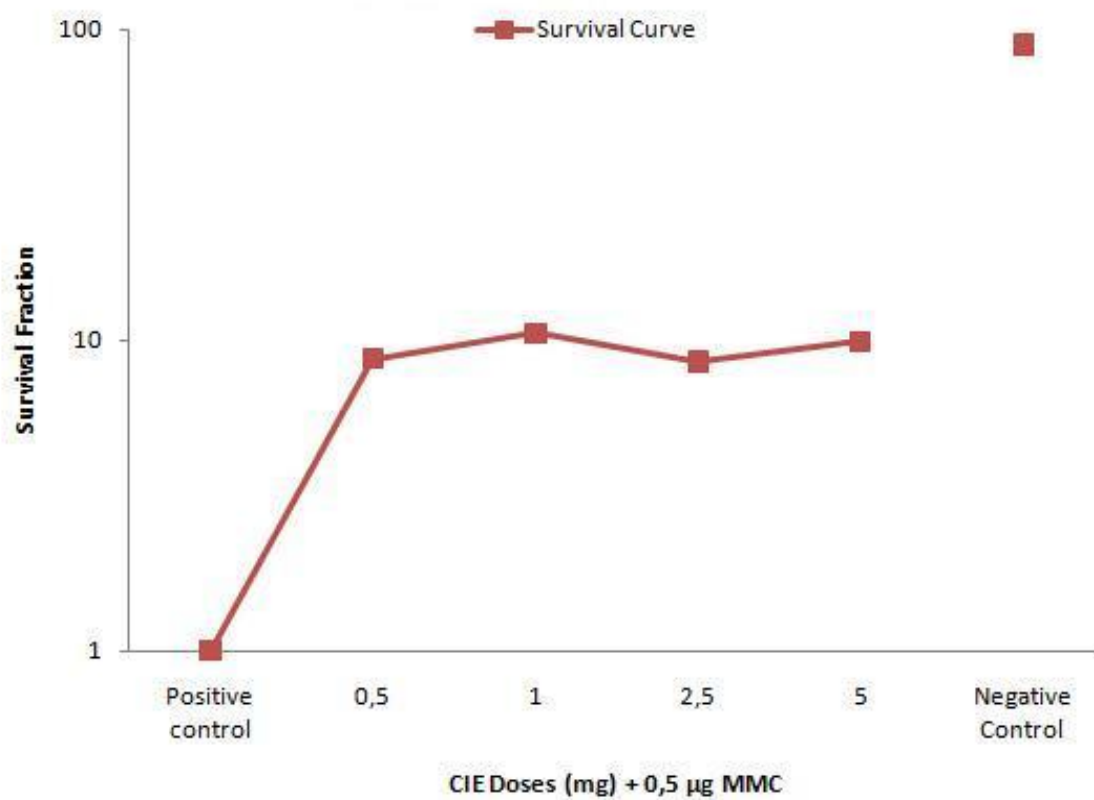


Figure 14 - Survival Fraction of the WP2s(λ) strain in relation to the CIE dose co-treated with MMC.

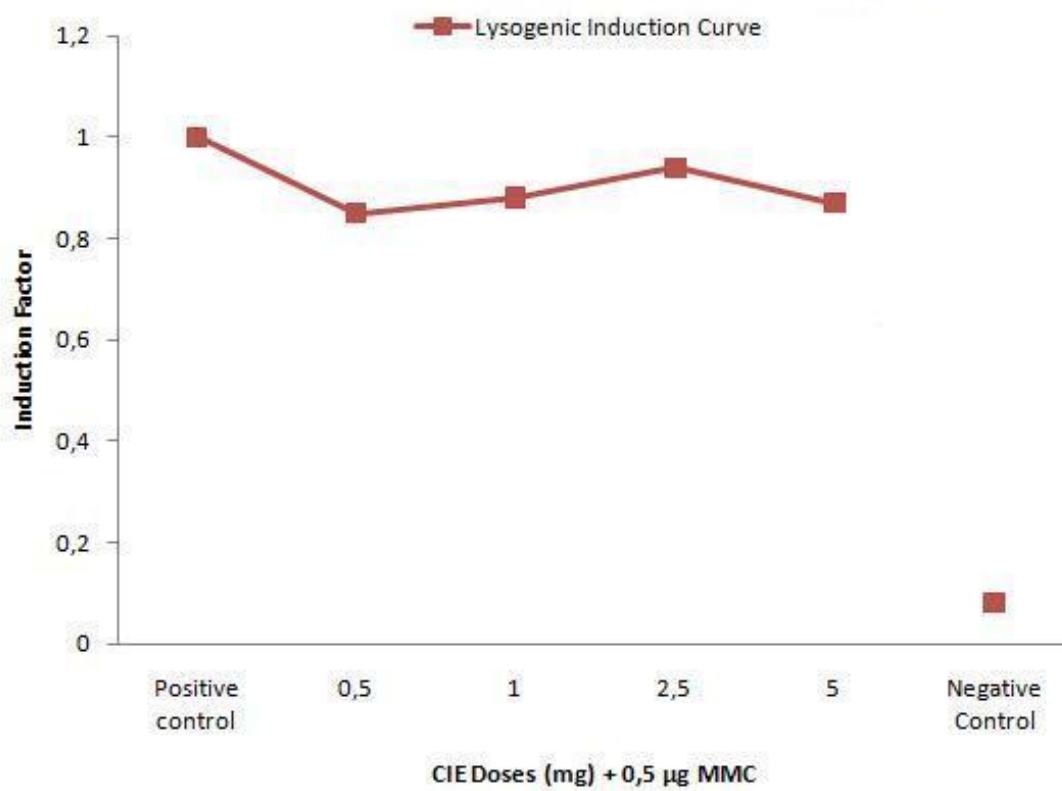


Figure 15 - Induction Factor of the WP2s(λ) strain in relation to the CIE dose co-treated with MMC.

7.2 Gráficos dos resultados obtidos no Teste do Micronúcleo

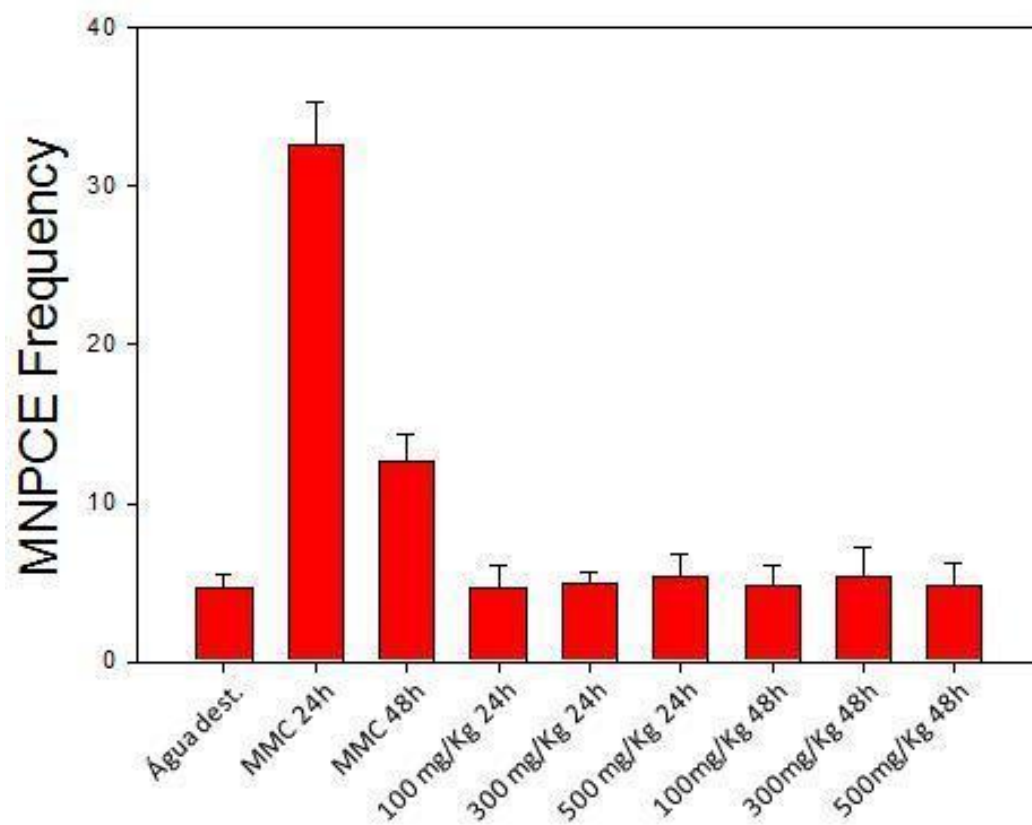


Figure 16 - MNPCE Frequencies after treatment with CIE extract.

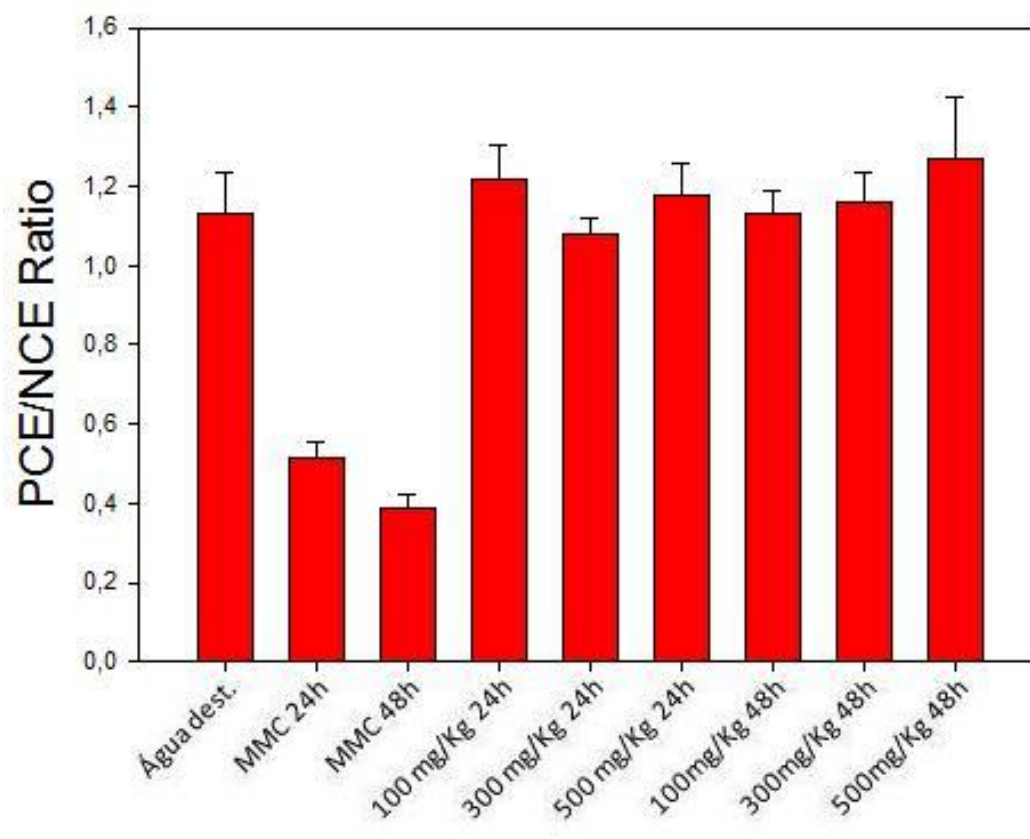


Figure 17 - PCE/NCE Ratio after treatment with CIE.

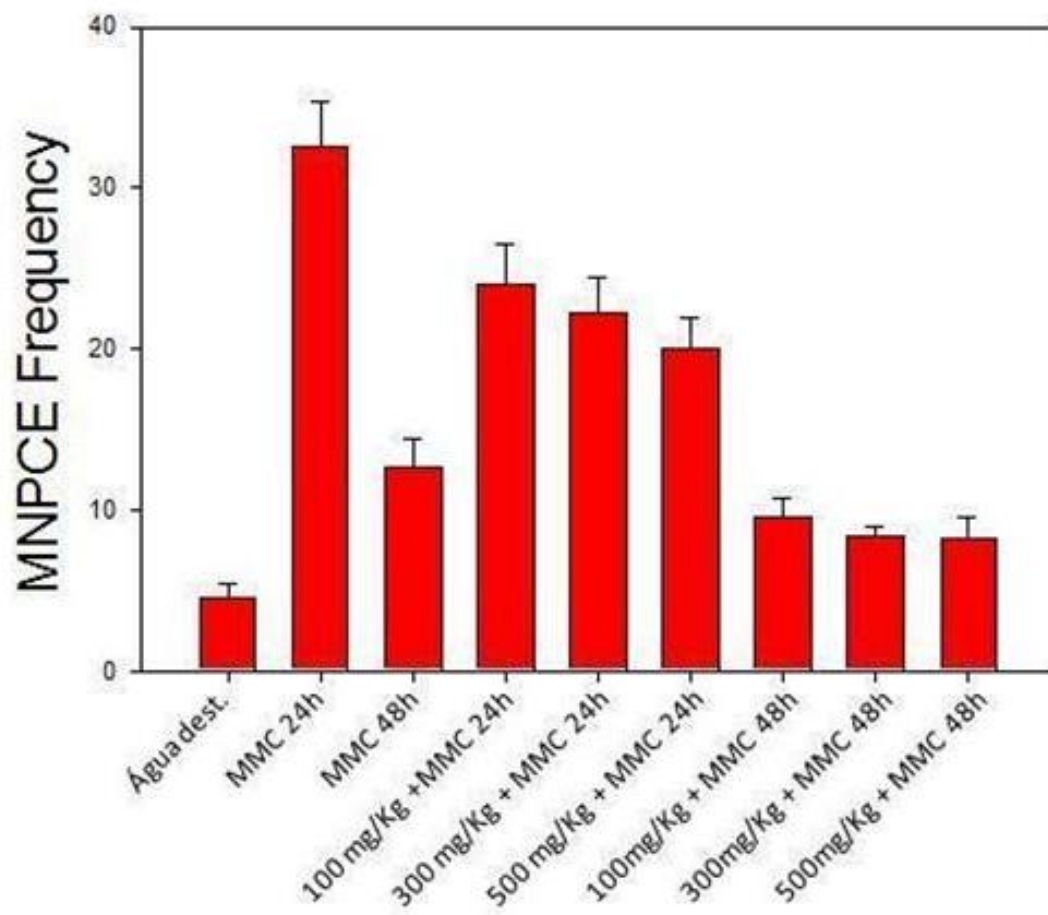


Figure 18 - MNPCE Frequencies after simultaneous treatment with CIE extract and MMC (4 mg / Kg).

Fi

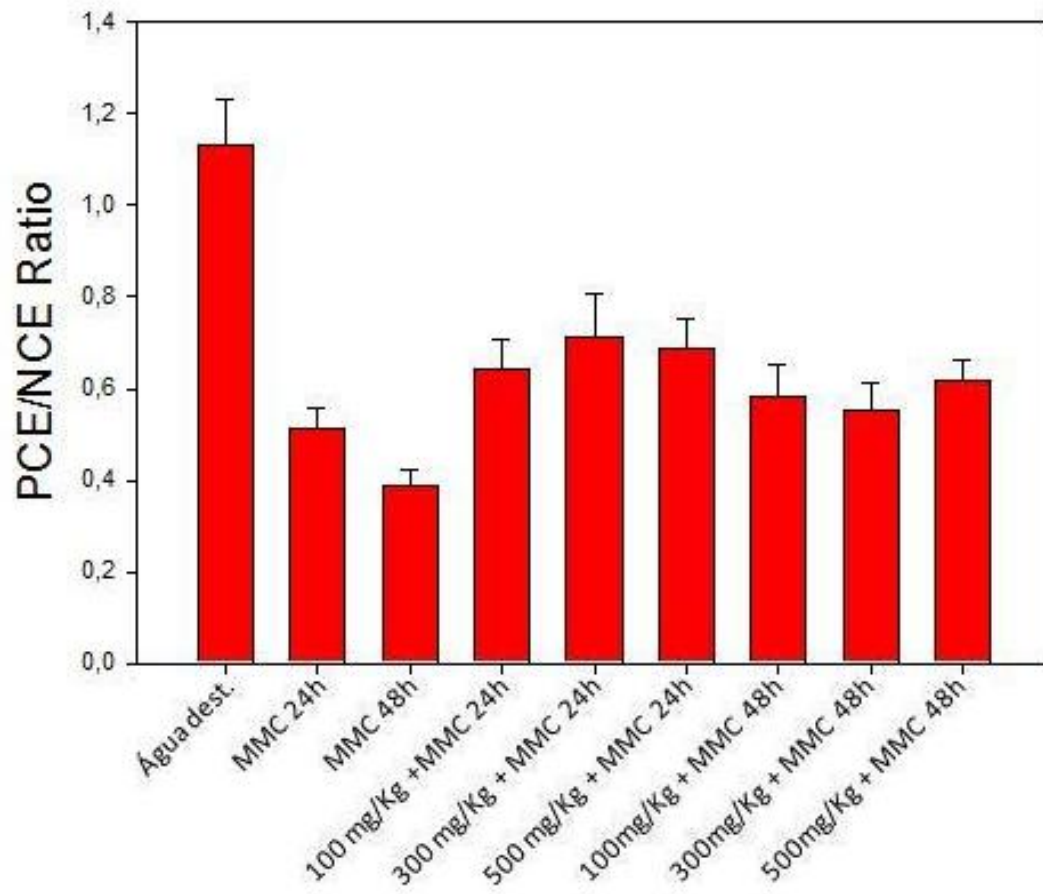


Figure 19 - PCE/NCE Ratio after simultaneous treatment with CIE and MMC (4 mg / Kg).