



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARESSA CRISTIANE MALINI DE LIMA

**“AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO EXTRATO AQUOSO  
DE *RHIZOPHORA MANGLE* UTILIZANDO CÉLULAS DE  
MAMÍFEROS EM ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*”**

MARESSA CRISTIANE MALINI DE LIMA

**“AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO EXTRATO AQUOSO  
DE *RHIZOPHORA MANGLE* UTILIZANDO CÉLULAS DE  
MAMÍFEROS EM ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*”.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como pré requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

L732a Lima, Maressa Cristiane Malini de.

Avaliação toxicogenética do extrato aquoso de *Rhizophora mangle* utilizando células de mamíferos em ensaios *in vitro* e *in vivo* / Maressa Cristiane Malini de Lima. – Londrina, 2011.  
74 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Mutagênese – Teses. 2. Genética – Expressão – Teses . 3. Apoptose – Indução – Teses. 4. Células cancerosas – Teses. 5. Rizoforacea – Teses. I. Cólus, Ilce Mara de Syllos. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

CDU

575.24

MARESSA CRISTIANE MALINI DE LIMA

**“AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DO EXTRATO AQUOSO DE  
*RHIZOPHORA MANGLE* UTILIZANDO CÉLULAS DE MAMÍFEROS  
EM ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*”.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ilce Mara de Syllos Cólus  
UEL - Londrina - PR

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roberta Losi-Guembarovski  
UEL - Londrina - PR

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Crispim Tavares  
UEL - Londrina - PR

Londrina, 22 de fevereiro de 2011

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe, Maria Inês Malini, pelo amor,  
dedicação e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por ter me dado força e coragem para realizar esse sonho. À minha mãe, mulher guerreira e corajosa, pela sua dedicação e amor, pois foi isso que me sustentou nessa longa caminhada. Ao meu pai Roberto, que partiu muito cedo, mas que deixou o seu exemplo de justiça e humanidade para que eu tentasse viver. Aos meus irmãos: Fabinho, Julinho e naninha por todos os esforços e sacrifícios que vocês fizeram por mim. Pelo investimento, pelo amor e principalmente por vocês terem acreditado. Ao Fred pelo seu amor e dedicação. Eu amo vocês!

As irmãs carmelitas pelas longas conversas, pelo olhar de incentivo e pelas orações que me sustentaram nos momentos difíceis.

Aos amigos Ira, Venilton, Aninha, Simone e Andréia, pelos momentos engraçados e fraternos que me motivaram e me alegraram diante de tantas dificuldades.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilce Mara de Syllos Cólus minha eterna gratidão pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela formação científica, investimentos e confiança no meu trabalho.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Tamie Matsumoto pela orientação e auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

À bolsista PNPd, Daniele Sartori, pelo treinamento e orientação nos ensaios de Biologia molecular.

Ao Laboratório Mutagênese e Oncogenética/ UEL, obrigada pelo convívio e ajuda durante o desenvolvimento do projeto. Em especial agradeço à Hellen e Mariana pela acolhida e amizade que sempre dedicaram a mim durante os dois anos que passei longe dos meus amigos e familiares.

À Suely, Secretária do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. À Coordenação do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular.

À Banca examinadora pelo aceite e pela ajuda na melhoria deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Genética e Biologia Molecular pela formação.

À Associação das Paneleiras de Goiabeiras por ter concedido a pesquisa.

À Universidade Estadual de Londrina pela infra-estrutura para a realização da pesquisa.

Ao Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória – FACITEC pelo financiamento do projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo – FAPES pelo financiamento do projeto.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

*“Eu sou ainda aquele mesmo menino teimoso de sempre...”*

**Mário Quintana**

LIMA, Maressa Cristiane Malini de. “**Avaliação toxicogenética do extrato aquoso de *Rhizophora mangle* utilizando células de mamíferos em ensaios *in vitro* e *in vivo***”. 2011. 70f. Dissertação ( Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

*Rhizophora mangle* L (Rhizophoraceae) é uma espécie nativa de manguezal e apresenta grande quantidade de polifenóis em sua casca. É utilizada na medicina popular como anti-séptico, antifúngico e cicatrizante e no município de Vitória/ ES/ Brasil é utilizada como matéria-prima para a confecção das tradicionais panelas de barro. O presente trabalho teve como objetivos avaliar as atividades citotóxica, pró-apoptótica, mutagênica e antimutagênica do extrato aquoso da casca de *R. mangle* L., bem como verificar a expressão de genes do estresse oxidativo (*SOD1*, *GPX1*), do biometabolismo de drogas (*GSTP1*) e de apoptose (*CASP9*) em células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC) cultivadas *in vitro*. O ensaio do MTT foi realizado com  $2 \times 10^4$  células expostas a diferentes concentrações do extrato (4,37 a 1120  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 horas. O índice de apoptose em células HTC tratadas com três concentrações de extrato (17,5; 28,0; 35,0  $\mu\text{g/mL}$ ) foi obtido utilizando-se o método de coloração diferenciada com laranja de acridina e brometo de etídeo. As mesmas concentrações do extrato foram avaliadas quanto às suas possíveis mutagenicidade e antimutagenicidade *in vitro* pelo ensaio do micronúcleo, sendo empregados, para a avaliação da atividade protetora, os protocolos de pré-tratamento, pós-tratamento, tratamento simultâneo e tratamento simultâneo com incubação. Para verificar a expressão gênica foi realizada a metodologia de RT-PCR em tempo real, utilizando-se 35,0  $\mu\text{g/mL}$  de extrato para o tratamento das células HTC. Também foi realizado ensaio de  $DL_{50}$  sob dose única intraperitoneal e mutagenicidade *in vivo*, com sangue periférico de camundongos submetidos a tratamento agudo e sub-agudo com três concentrações do extrato de *R. mangle*: 70 , 140 e 280 mg/Kg p.c. Os resultados obtidos mostraram que células HTC tratadas com extrato da casca de *R. mangle* não apresentaram nenhuma alteração quanto à viabilidade celular. A análise do índice apoptótico mostrou potencial pró-apoptótico do extrato a 35,0  $\mu\text{g/mL}$ . A  $DL_{50}$  *in vivo* foi de 560 mg/kg p.c. As três concentrações avaliadas não apresentaram mutagenicidade *in vitro* e *in vivo* e foi observado efeito protetor do extrato (35,0  $\mu\text{g/mL}$ ) em relação aos danos causados pela DXR (0,75 $\mu\text{g/mL}$ ) nos quatro protocolos de tratamentos usados. As porcentagens de redução de danos calculadas permitem afirmar que o extrato exerceu forte proteção quando foram utilizados os protocolos de pré-tratamento e tratamento-simultâneo, indicando uma atividade desmutagênica. A obtenção de porcentagens de redução de danos no DNA igual ou menor que 60% em tratamento simultâneo com pré-incubação leva à hipótese de que a atividade desmutagênica observada não ocorreu por interação extrato-DXR. Portanto, o extrato provavelmente atuou impedindo que a DXR atingisse a molécula de DNA. Dados da análise transcricional dos genes *SOD1*, *GSTP1* e *CASP9* mostraram aumento de expressão em células tratadas com extrato quando comparadas com o controle. Portanto, o efeito protetor encontrado em células HTC provavelmente deve ser devido ao aumento das defesas antioxidantes que este extrato exerce sobre as células. A indução de apoptose pelo extrato na

concentração de 35,0 µg/mL também foi confirmada pela análise transcricional do gene *CASP9*, o que infere a atuação deste extrato por ativação de caspases.

**Palavras-chave:** Mutagenicidade. *Rhizophora mangle*. Células de Hepatoma de *Rattus norvegicus*. Expressão gênica.

LIMA, Maressa Cristiane Malini de. “**Toxicogenetics assessment of aqueous extract of *Rhizophora mangle* in mammalian cells using *in vitro* and *in vivo*”**. 2011. 70f. Dissertation (Mester's degree in Genetics and Molecular Biology) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## ABSTRACT

*Rhizophora mangle* L (Rhizophoraceae) is a native species of marsh and has a large amount of polyphenols in its bark. It is used in folk medicine as an antiseptic, antifungal and healing. In Vitória / ES / Brazil is used as raw material for the confection of traditional clay pots. This study aimed to evaluate the cytotoxic, pro-apoptotic, mutagenic and antimutagenic effects of the aqueous extract of the bark of *R. mangle* L., and the expression of genes involved in oxidative stress (SOD1, GPX1), biometabolism drugs (GSTP1) and apoptosis (CASP9) in hepatoma cells of *Rattus norvegicus* (HTC) *in vitro*. The MTT assay was performed with  $2 \times 10^4$  cells exposed to different concentrations of the extract (4.37 to 1120 mg/mL) for 24 hours. The rate of apoptosis in HTC cells treated with three concentrations of extract (17.5, 28.0, 35.0 mg/mL) was obtained using the method of differential staining with acridine orange and ethidium bromide. The same concentrations of the extract were evaluated for their mutagenic and antimutagenic potentials *in vitro* by micronucleus assay. For the evaluation of protective activity, the protocols of pre-treatment, post-treatment, simultaneous treatment and simultaneous treatment with incubation were employed. Gene expression was verified performing the RT-PCR method, using 35.0 mg/mL of the extract for the treatment of HTC cells. The evaluation of mutagenicity *in vivo* was also performed in peripheral blood cells of mice submitted to acute and subacute treatments with three concentrations of *R. mangle* extract: 70, 140 and 280 mg/kg b.w.. The results showed that HTC cells treated with the extract from the bark of *R. mangle* showed no change on the cell viability. Analysis of apoptotic cells showed pro-apoptotic potential of the extract in the concentration of 35.0 mg/mL. The *in vivo* LD50 was 560 mg/kg b.w. The concentrations tested showed no mutagenicity *in vitro* and *in vivo* and it was observed protective effect of the extract at 35.0 mg/mL in relation to the damages caused by DXR (0.75 mg/mL) in the four treatment protocols used. The percentages of damages reduction indicate that the extract had a strong protective effect when the pre-treatment and treatment-simultaneously protocols were used, indicating an desmutagenic activity. The percentages of damage reduction equal to or less than 60% by simultaneous treatment with pre-incubation led to the hypothesis that the activity observed was not caused by desmutagenic mechanism. Therefore, the extract probably acted by preventing DXR to reach the DNA. Data from transcriptional analysis of the genes *SOD1*, *GSTP1* and *CASP9* showed an increased expression in cells treated with the extract when compared with control. Therefore, the protective effect found in HTC cells, is probably due to increase of antioxidant defenses that this extract exerts on the cells. Induction of apoptosis by the extract at 35.0 g/mL was also confirmed by transcriptional analysis of *CASP9*, which implies the action of this extract by activation of caspases.

**Keywords:** Mutagenicity. *Rhizophora mangle*. Hepatoma Cells of *Rattus norvegicus*. Gene expression.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	GERAL .....	13
2.2	ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
3.1	MUTAGÊNESE E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO .....	14
3.2	ANTIMUTAGÊNESE E ANTIOXIDANTES NATURAIS .....	16
3.3	RHIZOPHORA MANGLE L .....	18
3.4	CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS IN VITRO.....	21
3.5	TESTES DE CITOTOXICIDADE IN VITRO .....	23
3.6	TESTE DO MICRONÚCLEO COM SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS .....	24
3.7	APOPTOSE .....	25
3.8	RT-PCR EM TEMPO REAL .....	26
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
	<b>ARTIGO A - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE RHIZOPHORA MANGLE L. IN VIVO E IN VITRO</b> .....	35
	<b>ARTIGO B - EFEITO ANTIMUTAGÊNICO, ATIVAÇÃO DE APOPTOSE E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES PROMOVIDOS PELO EXTRATO AQUOSO DE RHIZOPHORA MANGLE L. EM CÉLULAS DE HEPATOMA DE RATOS (HTC) IN VITRO</b> .....	53

## 1 JUSTIFICATIVA

As plantas são fontes naturais de compostos antioxidantes, ou seja, durante o seu metabolismo secundário produzem compostos que atuam na proteção contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (ERO), formadas pela presença e utilização do oxigênio nos seus tecidos (FILHO *et al.*, 2001). Dentre os diversos grupos de metabólitos secundários com atividade antioxidante destacam-se os compostos polifenólicos. Estes compostos apresentam uma estrutura química redutora, fato que confere a eles a capacidade sequestradora de radicais livres (SANTOS; MELLO, 1999).

A espécie *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) é uma planta típica do manguezal de toda a costa do Oceano Atlântico e destaca-se por apresentar grande quantidade de compostos polifenólicos, concentrados, principalmente, em sua casca. A presença destes compostos antioxidantes desperta o interesse por pesquisas que visem investigar suas atividades biológicas, a fim de descobrir novos compostos quimioprotetores.

Estudos anteriores realizados por nosso grupo com o extrato aquoso de *R. mangle* revelaram ausência de atividade mutagênica e considerável atividade antimutagênica *in vivo* (*Allium cepa*) e *in vitro* (células CHO-K1) deste extrato..

O presente estudo teve o intuito de dar continuidade ao projeto iniciado na Universidade Federal do Espírito Santo, tendo como foco, agora, a avaliação do extrato de *R. mangle* em ensaios de curta duração *in vitro* e *in vivo* em células de mamíferos.

A mutagenicidade do extrato foi avaliada em células do sangue periférico de camundongos *in vivo*, uma vez que este ensaio permite a análise do processo metabólico, bioquímico e fisiológico (BOONE; KELLOFF, 1990; ARGMANN; CHAMBON, 2005).

Nos ensaios *in vitro* foram empregadas células metabolizadoras (células de hepatoma de *Rattus norvegicus*), a fim de se avaliar os potenciais citotóxico, pró-apoptótico, mutagênico e antimutagênico do extrato após o processo de metabolização *in vitro*. Estes testes com células de mamíferos são rotineiramente utilizados para uma triagem inicial dos efeitos biológicos de plantas, devido à sua maior reprodutibilidade e aos menores períodos experimentais do que os testes *in*

*vivo*. Posteriormente a esta etapa, foi avaliada a expressão de genes relacionados com defesa antioxidante, do biometabolismo e de apoptose por meio da análise de PCR em tempo real.

As avaliações realizadas no presente estudo poderão contribuir para o conhecimento sobre efeitos citotóxicos, mutagênicos e protetores do extrato aquoso de *R. mangle*, além de auxiliar na identificação de possíveis mecanismos moleculares de ação do extrato.

Os resultados obtidos no presente estudo, associados aos já existentes na literatura permitirão recomendar o extrato de *R. mangle* como agente medicinal, além de estimularem a realização de outras investigações com este composto e a triagem de novas substâncias para o desenvolvimento de novos fármacos com atividades quimioprotetoras.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as atividades citotóxica, pró-apoptótica, mutagênica e antimutagênica do extrato da casca de *Rhizophora mangle*, bem como verificar a expressão de genes envolvidos na defesa antioxidante, biotransformação de drogas e de apoptose.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Utilizar o extrato aquoso da casca de *R. mangle* para:

- Avaliar seu possível efeito mutagênico em células do sangue periférico de camundongos *in vivo* por meio do teste do micronúcleo.
- Avaliar seu possível efeito citotóxico em cultura de células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), por meio do ensaio do MTT.
- Avaliar seu potencial pró-apoptótico em cultura de células HTC.
- Avaliar os possíveis efeitos mutagênico e antimutagênico em cultura de células HTC por meio do ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese *in vitro*.
- Quantificar a expressão dos genes: *SOD1*, *GPX1* (estresse oxidativo), *GSTP1* (biotransformação de drogas) e *CASP9* (apoptose) em nível de RNAm através da técnica de PCR em tempo real em culturas de células HTC.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 MUTAGÊNESE E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO

A molécula de DNA está constantemente sujeita à formação de lesões, sejam elas espontâneas, causadas naturalmente durante os processos de replicação e reparo de DNA ou induzidas por exposição a agentes mutagênicos. Se essas lesões forem fixadas, tem-se uma mutação estabelecida.

A maioria dos compostos mutagênicos atua diretamente no material genético, devido à sua capacidade de modificar uma determinada base no DNA, ou de incorporar-se ao ácido nucléico (SUGIMURA, 2000; LEWIN, 2009). Os agentes mutagênicos podem ser físicos, como as radiações ionizantes e a luz ultravioleta presentes no meio ambiente; químicos, como os xenobióticos e produtos do metabolismo celular ou biológicos, resultantes de infecção viral ou bacteriana.

Dentre os produtos do metabolismo celular que interagem com a molécula de DNA, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ERO), cuja principal característica é a presença de um elétron desemparelhado nos átomos de oxigênio (VISIOLI *et al.*, 2000; FINKEL E HOLBROOK, 2000; HALLIWELL, 2000; PIETTA, 2000). A presença deste elétron desemparelhado confere às ERO a capacidade de receberem elétrons de outras moléculas, levando às suas oxidações (DU; LOU, 2008). Dentre as diversas ERO existentes, destacam-se o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ) e o radical peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ).

A produção de ERO acontece de forma contínua dentro das células, como resultado do metabolismo oxidativo aeróbico durante o processo mitocondrial de transferência de elétrons ou como bioprodutos das enzimas xantina oxidase, lipoxidases e ciclo-oxigenases. Além disso, as ERO podem ser geradas durante o metabolismo intracelular de xenobióticos e toxinas, pelas enzimas da super família do citocromo *P450* monoxigenase, ou devido à exposição a fatores ambientais. Uma outra fonte capaz de produzir ERO são os macrófagos e neutrófilos, que contêm enzimas como NADPH oxidase complexa, capazes de gerar radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio (ROSEN *et al.*, 1995).

As ERO estão associadas a fatores importantes nos organismos vivos, pois estão envolvidas no processo de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (MASELLA *et al.*, 2005). No entanto, seu excesso apresenta efeitos altamente prejudiciais, pois podem interagir com macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas e DNA, induzindo oxidação e causando danos às membranas, inativando enzimas e gerando lesões no DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; VALKO *et al.*, 2004).

O mecanismo de indução de danos na molécula de DNA abrange desde processos de oxidação de purinas e pirimidinas até lesões diretas na molécula, tais como quebras cromatídicas ou cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs (MCCAL; FREI, 1999). Durante o processo de oxidação de ácidos nucleicos as ERO são capazes de reagir com as bases nitrogenadas formando uma variedade de bases modificadas, sendo 8-hidroxi-guanina (8-OHG) a mais importante, pois representa uma base pré mutagênica, por ter a capacidade de indução de transversões G → T (DIZDARAGLU, 1991, SHIBUTANI *et al.*, 1991). Além da formação de compostos reativos pela oxidação de bases, as ERO podem induzir danos na molécula de DNA através da reação de Fenton e/ou pela ativação de nucleases. Tal processo consiste na oxidação do peróxido de hidrogênio em radical hidroxil (HO<sup>•</sup>), catalisada por íons metálicos ligados à molécula de DNA. A presença de HO<sup>•</sup> no núcleo pode levar à sua ligação com as bases nitrogenadas do DNA, resultando em fragmentação e modificação das bases, preferencialmente a guanina (MELLO FILHO; MENEGHINI, 1984). A ativação de nucleases é resultado da ação das ERO em uma série de eventos metabólicos da célula, resultando na clivagem da molécula de DNA (HALLIWELL; ARUOMA, 1991).

Em condições normais a concentração de ERO dentro das células é baixa, devido ao processo de homeostase redox intracelular desempenhado por sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos (endógeno) e não-enzimáticos (exógeno), que removem ou impedem sua formação. Quando esta homeostase é alterada, tem-se estabelecido o processo de estresse oxidativo, conhecido por desempenhar um papel central na patogênese do envelhecimento e várias doenças degenerativas, como aterosclerose, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e câncer (GUTTERIDGE, 1993; KEHRER, 1993).

O sistema enzimático de defesa antioxidante tem o papel de converter as ERO em compostos menos nocivos para o organismo. Este sistema é constituído por uma primeira linha de defesa, que compreende as enzimas superóxido dismutase, catalase, tioredoxina redutase, peroxiredoxina e glutathione peroxidase (HAYES; MCLELLAN, 1999). Estas enzimas têm o papel de defender o organismo contra os peróxidos de hidrogênio e o ânion superóxido. Entretanto, esta primeira linha de defesa não é capaz de eliminar 100% das ERO, já que alguns compostos originados da interação de ERO com macromoléculas são altamente reativos. Desta forma, o organismo dispõe de uma segunda linha de defesa enzimática constituído por enzimas glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, aldo-aceto redutase e aldeído desidrogenase (ARMSTRONG, 1997; BRIGELIUS-FLOHE, 1999; KUHN; BORCHERT, 2002).

Os sistemas de defesa não-enzimáticos abrangem compostos ingeridos na dieta, ou seja, compostos antioxidantes de origem exógena. Entre estes destacam-se os compostos polifenólicos. Estas substâncias têm sido amplamente estudadas devido à sua capacidade antioxidante e, mais recentemente, por propriedades adicionais de regulação de atividades celulares, como alterações da atividade de diferentes enzimas, como telomerase, ciclo-oxigenases (LAUGHTON *et al.*, 1991); lipoxigenases (SCHEWE *et al.*, 2001); xantina oxidase (DEC *et al.*, 2002); proteínas quinases (GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999) e enzimas detoxificantes (BIRT *et al.*, 2001). Os compostos polifenólicos também interagem nas vias de transdução de sinais (SPENCER *et al.*, 2003); com receptores de células (MUELLER *et al.*, 2004); com as vias caspases-dependentes (WAY *et al.*, 2005) e podem interferir junto às ciclinas na regulação do ciclo celular (FISCHER *et al.*, 2000);

### 3.2 ANTIMUTAGÊNESE E ANTIOXIDANTES NATURAIS

A antimutagênese é empregada para designar os agentes que são capazes de reduzir a frequência ou a taxa de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo envolvido (WALTERS *et al.*, 1990). De acordo com KADA *et al.* (1982), os eventos antimutagênicos são classificados conforme seu mecanismo de ação em agentes desmutagênicos e bioantimutagênicos. Os agentes

desmutagênicos atuam inativando os agentes mutagênicos antes destes interagirem com o material genético, química ou enzimaticamente, ou modulando o sistema de defesa antioxidante. Os agentes bio-antimutagênicos atuam sobre o mecanismo de reparo do DNA, resultando na diminuição da fixação das mutações.

Substâncias antioxidantes têm sido amplamente estudadas, pois apresentam afinidade por espécies reativas de oxigênio (ERO) e, dessa forma, interrompem a sua formação ou as sequestram antes delas alcançarem a molécula de DNA (HALLIWELL, 1997).

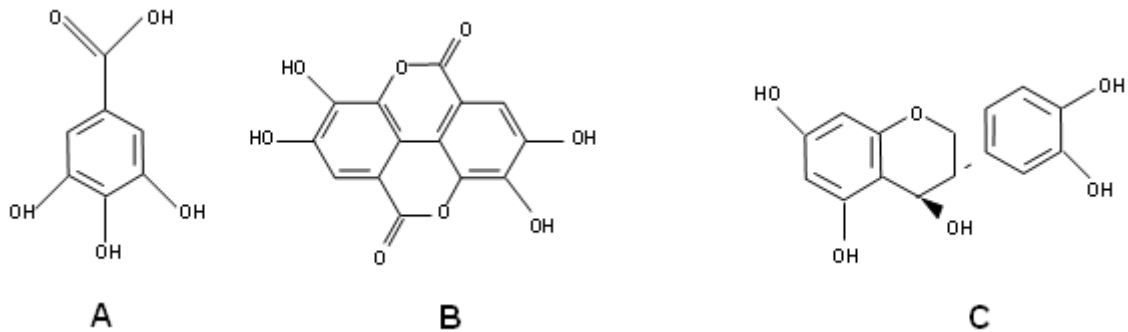
Estudos *in vitro* revelam que o sequestro de radicais livres por substâncias antioxidantes inibe a peroxidação lipídica, que por sua vez impede a formação de aldeídos altamente reativos, o que proporciona uma proteção ao DNA (RATT, 1988; MORA *et al.*, 1990; TERAQ *et al.*, 1994; VINSON *et al.*, 1995). Dados de mais de 200 estudos epidemiológicos sugerem uma associação entre o consumo de frutas e legumes, ricos em antioxidantes naturais, com a baixa incidência de câncer (WLODEK; STEVEN, 2001).

Um dos antioxidantes vegetais de grande destaque são os taninos, compostos polifenólicos produzidos pelo metabolismo secundário de várias plantas superiores. Estes compostos são classificados de acordo com a sua estrutura química em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis apresentam na sua constituição monômeros de ácido gálico (tanino gálico) ou de ácido elágico (tanino elágico), enquanto os taninos condensados são formados pela polimerização de unidades de catequinas (Figura 1) (PAIVA *et al.*, 2002).

O poder antioxidante dos taninos confere uma defesa química para o vegetal, bem como desperta o interesse para estudos de antimutagenicidade, uma vez que eles podem atuar no processo de estabilização de radicais livres. Segundo SILVA *et al.* (2003), o potencial antioxidante dos taninos permite que eles atuem em vias antimutagênicas e, dessa forma, consigam capturar os radicais livres, contribuindo para a manutenção da estabilidade da célula. Segundo YOKOZAWA *et al.* (1998), esse poder antioxidante é observado mesmo em baixas concentrações.

Dentre as inúmeras atividades farmacológicas atribuídas aos taninos, destacam-se a ação antitumoral (WANG *et al.*, 1999; DUFRESNE; FARNWORTH, 2001); inibição da peroxidação lipídica; seqüestro de radicais livres

(HAGERMAN *et al.*, 1998) e ação anti-inflamatória (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001).



**Figura 1** – Estrutura química básica dos taninos hidrolisáveis e condensados. A) Ácido gálico. B) Ácido elágico. C) Catequinas.

### 3.3 *RHIZOPHORA MANGLE* L.

Os produtos naturais são tradicionalmente utilizados como agentes terapêuticos e suplementos dietéticos, tanto por culturas orientais quanto por ocidentais. Um estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde indica que 70-80% da população mundial ainda depende de ervas da medicina tradicional para a sua saúde (CHAN, 2003). No Brasil a medicina popular baseada na utilização de plantas medicinais é fortemente difundida na população, muito provavelmente pela influência das culturas indígenas (MARTINS *et al.*, 2000). O contato e acesso direto destas populações com a natureza proporcionou as práticas curativas das tribos indígenas e um conhecimento sobre a flora medicinal brasileira. Atualmente este conhecimento está sendo utilizado por cientistas para a investigação de novos medicamentos.

*Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) é uma espécie bastante difundida nos manguezais brasileiros e conhecida popularmente como manguê vermelho, devido ao alto teor de compostos polifenólicos presentes em sua casca. Destaca-se na medicina popular por apresentar atividades fungicida, antibacteriana, anti-inflamatória, antiulcerogênica e devido à sua eficácia na cicatrização de feridas

abertas (TAKARA *et al.*, 2008). Estudos conduzidos por Gutiérrez *et al.* (2001) utilizando modelos *in vivo*, comprovaram atividade antisséptica do extrato aquoso da casca de *R. mangle* sobre feridas abertas de coelhos e bovinos, prevenindo-os contra infecções secundárias e, conseqüentemente, contribuindo para a eficiência do processo de cicatrização.

Outro foco de estudo bem descrito na literatura é o efeito protetor que este extrato exerce sobre úlceras gástricas induzidas em ratos. Foi observada alta porcentagem de inibição de lesões gástricas por *R. mangle* frente a danos induzidos por etanol-ácido clorídrico. O tratamento com *R. mangle* foi cerca de quatro vezes mais eficiente (94,6%) do que o tratamento típico com cimetidine (21,5%). Além do forte efeito antiulcerogênico, o extrato de *R. mangle* estimulou o aumento da produção de muco e de proteína na mucosa gástrica dos ratos (PERERA *et al.*, 2001). SÁNCHEZ *et al.* (2006) utilizaram diclofenaco para induzir úlceras gástricas em ratos pré-tratados com o extrato de *R. mangle* e demonstraram, por meio de estudos histopatológicos, que a mucosa do estômago dos animais foi protegida pelo extrato, de forma semelhante à droga omeprazol.

Pesquisas também apontam o extrato de *R. mangle* como um possível candidato ao tratamento de infecções uterinas. Em ensaios prévios com coelhas tratadas com este extrato não foi observada irritabilidade da mucosa vaginal (AGUERO *et al.*, 2005). Este estudo é concordante com outros autores, que avaliando toxicidade aguda, ensaios pré-clínicos em ratas e em outros animais, não encontraram efeitos irritantes do extrato de *R. mangle* (FIGUEROA *et al.*, 1995; GUTIÉRREZ *et al.*, 2001).

Vários estudos procuraram comprovar e compreender a atividade antioxidante deste extrato utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. SANCHEZ *et al.* (2006) atribuíram a atividade antioxidante à sua capacidade de quelar íons ferro. BERENGUER *et al.* (2006) mostraram que o tratamento com o extrato de *R. mangle* em ratos sob estresse oxidativo, aumentou a atividade glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, enzimas responsáveis pela proteção contra danos oxidativos e hemólise. SANCHÉZ *et al.* (2005), estudando hemólise em células de cérebro de ratos, concluíram que o extrato de *R. mangle* foi capaz de inibir a peroxidação lipídica. De acordo com estes autores, o extrato de *R. mangle* protege a hemólise nessas células por um dos três mecanismo: i) atuando como antioxidantes, agindo diretamente na redução da formação de radicais livres; ii) mantendo ou regenerando

$\alpha$ -tocoferol e outros antioxidantes, doando hidrogênio ou iii) agindo como quelantes, neutralizando os metais redox  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , envolvidos na propagação do estresse oxidativo.

O forte potencial desta planta frente a patologias que acometem a pele e a sua grande eficácia contra micro-organismos patogênicos, despertou o interesse de um grupo de pesquisa do Centro Nacional de Sanidade Agropecuária de Cuba, que desenvolveu duas formulações à base de extratos obtidos desta espécie para o uso veterinário e humano. Estas formulações cubanas - Cikron® e Udertan®- apresentam grande alternativa terapêutica para a saúde pública e medicina veterinária cubana, já que o último é indicado pelo Programa Nacional de Controle à Mastite Bovina, doença bastante prejudicial e onerosa para a produção de leite naquele país e em todo o mundo (SANCHÉZ *et al.*, 2006).

A inocuidade e segurança destas formulações já foram comprovadas por estudos de toxicidade aguda, irritabilidade cutânea e ensaios preliminares de genotoxicidade. Para avaliar o mecanismo de ação destes fármacos foram utilizados vários modelos *in vivo*, tais como ratos, coelhos e suínos. Uma longa triagem farmacognóstica também foi realizada, onde se identificou no extrato a presença de 49,8% de taninos (SANCHÉZ, 1998). A presença majoritária de taninos nesta espécie justifica o grande potencial dessas formulações em doenças que afetam a pele. Acredita-se que esses polifénóis podem atuar na estimulação da proliferação de células endoteliais, promovendo a cicatrização da epiderme e também na formação de complexos polifenol-proteína ou polifenol-polissacarídeos, produzindo uma camada impermeável, que ajuda nos processos de cicatrização, queimadura e inflamações (HASLAM, 1996).

A aceleração do processo de cicatrização produzida pelo fitofármaco Cikron® em animais, também foi obtida com sucesso em seres humanos por meio de estudo com pacientes com feridas pós-operatórias e ulcerações orais. As feridas tratadas com Cikron® cicatrizaram com maior rapidez do que as tratadas com mercúrio cromo. Nenhum dos pacientes tratados com esta formulação apresentou efeitos adversos. A avaliação clínica dos pacientes com ulcerações orais submetidos a tratamento com o Cikron® revelou redução no tempo de cura quando comparado a pacientes que não foram submetidos ao fitofármaco natural. Acredita-se que esta redução pode ser devida ao sequestro de radicais hidroxilas e superóxidos, que

possuem fortes propriedades oxidantes, resultando em danos teciduais (ARMAS *et al.*, 2005).

Outro fator de relevância deste extrato, porém de cunho cultural, é a sua utilização milenar como matéria-prima para a confecção das tradicionais panelas de barro no Brasil, mais especificamente no estado do Espírito Santo. O extrato aquoso de *Rhizophora mangle* é utilizado durante a etapa de açoitamento, para o curtimento e impermeabilização da panela, exercendo uma função antifúngica (Figura 2).



**Figura 2** – Etapas da confecção das panelas de barro no Município de Vitória/ES pela Associação das Paneleiras de Goiabeiras. A) modelagem, B) secagem e polimento, C) queima, D e E) açoitamento, no qual o extrato de *R. mangle* é utilizado para curtimento e impermeabilização da panela recém fabricada, F) panela armazenada na associação das paneleiras de Vitória/ES.

### 3.4 CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO*

O potencial mutagênico e antimutagênico de fitoquímicos presentes em extratos de plantas e fungos tem sido amplamente avaliado por meio de testes de curta duração com o sistema de célula de mamíferos. Essa ampla utilização é devida a várias vantagens que esse sistema-teste apresenta, tais como a facilidade de padronização das condições experimentais (temperatura, pH, composição do

meio de cultura, densidade populacional); a uniformidade metabólica e comportamental do material; a possibilidade dos tratamentos das células serem realizados em várias fases do ciclo celular; rapidez; economia; boa reprodutividade; organização dos cromossomos e de seu DNA igual às células *in vivo* (RABELLO - GAY *et al.*, 1991).

Os experimentos com cultura de células de mamíferos são bastante utilizados devido às questões éticas sobre a utilização de animais. São empregados diversos tipos celulares, como as células humanas HeLa, HepG-2, HL-60; células de roedores HTC, CHO-K1, V79; células bovinas, como a CPAE; células caninas, como a MDCK; células suínas, como LLCPKI e células de macaco, como a Vero (FRESHNEY, 2005).

Uma ferramenta importante a ser considerada nos ensaios de mutagenicidade e/ou antimutagenicidade é o processo de biometabolização que acontece com os compostos nos organismos vivos. Desta forma, é importante nos estudos *in vitro*, o uso de células que apresentem sistema endógeno de metabolização, como por exemplo, células hepáticas. Este parâmetro é importante porque durante a biotransformação de um composto, pode haver ativação ou inativação, podendo o metabólito responder de forma diferente em relação à sua estrutura química inicial.

Neste contexto, as células de hepatoma de *Rattus norvegicus* recebem destaque na avaliação da mutagenicidade de diversos compostos. São células originadas de fígado de rato e expressam as enzimas de fase I e de fase II do processo de metabolização de substâncias químicas (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A literatura relata grande sensibilidade de células HTC na detecção de danos cromossômicos. De acordo com Dean *et al.* (1980), células HTC mostraram-se 200 vezes mais sensíveis do que as células V79 na indução de trocas entre cromátides irmãs pela aflatoxina B1. BELLINI *et al.* (2006), estudando o potencial mutagênico de extrato n-butanólico do cogumelo *Agaricus blazei* em linhagens CHO-K1 e HTC, detectaram maior frequência de micronúcleos nas células HTC. Desta forma, a alta atividade metabólica presente neste tipo celular seria responsável pela grande sensibilidade descrita na literatura para essas células, durante a avaliação de diversas substâncias (GAD, 2000).

### 3.5 TESTES DE CITOTOXICIDADE IN VITRO

De acordo com o *guideline* da OECD (Organization for Economic Co-operation and Development, 2004), para testar substâncias químicas usando o teste do micronúcleo *in vitro* (2004), devem ser avaliadas, no mínimo, três concentrações diferentes da droga. Estas deverão ser escolhidas dos dados obtidos de estudos preliminares sobre citotoxicidade da substância teste. Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para verificar a toxicidade de novos compostos, principalmente quando se está verificando sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO *et al.*, 2000). Esses testes são necessários para definir as concentrações a serem utilizadas em experimentos *in vitro* posteriores.

O ensaio MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) foi descrito por Mosmann em 1983 e, desde então, tem sido usado para avaliar citotoxicidade, viabilidade celular, proliferação de células vivas após exposição a substâncias tóxicas em culturas de células. Também pode ser usado para ensaios de toxicidade de novos fármacos para a comercialização (MOSMANN, 1983; BERRIDGE; TAN, 1993; LIU *et al.*, 1997).

O ensaio MTT é um ensaio colorimétrico de medida de atividade mitocondrial. Baseia-se na absorção do sal MTT pelas células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pela ação da enzima succinato desidrogenase a um produto chamado formazan, cuja coloração é roxa. Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído através da adição de DMSO ou outro solvente apropriado (MOSMANN, 1983). A capacidade das células em reduzirem o MTT fornece uma indicação da atividade e da integridade mitocondrial, que são interpretadas como medidas da viabilidade celular. Ao contrário de outros ensaios de citotoxicidade, o ensaio do MTT apresenta algumas vantagens, como rapidez e precisão (MOSMANN, 1983).

### 3.6 TESTE DO MICRONÚCLEO COM SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS

Micronúcleos (MN) são pequenos corpos contendo DNA, localizados no citoplasma das células. São resultados de fragmentos acêntricos, originados de quebra isocromatídica ou cromatídica ou da perda de cromossomos inteiros devido a disfunções no fuso mitótico (RABELLO-GAY *et al.*, 1991). Segundo FENECH (2000), os MN devem apresentar envoltório que os separe da membrana nuclear, possuírem coloração similar à do núcleo principal, apresentarem um diâmetro com cerca de 1/16 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal da célula e não estarem conectados ao núcleo principal.

O teste para avaliação do micronúcleo foi proposto de forma independente por SCHMID (1975) e HEDDLE (1977), que utilizavam células da medula óssea de roedores para a análise citogenética. Após a primeira versão o teste do micrónúcleo sofreu algumas modificações.

Fenech e Morley (1985) padronizaram a versão *in vitro*, denominada de teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese. Esta metodologia utiliza o composto denominado citocalasina-B, cuja função é inibir a formação de microfilamentos de actina, bloqueando a citocinese sem a divisão dos núcleos, o que resulta num acúmulo de células binucleadas (FENECH, 2000). Esta variação da técnica transformou o teste do micronúcleo em uma ferramenta útil na triagem de danos genéticos *in vitro*, porque permitiu diferenciar as células que passaram por divisão das que não passaram, bem como analisar o micronúcleo originado do dano induzido, apenas através da análise de células binucleadas (FENECH; MORLEY, 1985; FENECH, 2000).

Hayashi (1990) modificou a versão *in vitro*, substituindo células da medula óssea de roedores por células do sangue periférico, o que tornou a metodologia mais rápida e de fácil análise, devido à homogeneidade da amostra celular. Isso foi bastante valioso, pois a partir de uma pequena amostra de sangue é possível realizar todo o experimento.

Com esta grande diversidade de padronização, o teste do micronúcleo é intensamente utilizado em diversos organismos e tipos celulares, que vão desde espécies vegetais como *Allium cepa*, passando por mamíferos e até

mesmo em seres humanos, por meio da versão de células da mucosa bucal e sangue periférico.

### 3.7 APOPTOSE

A apoptose consiste na morte celular programada e é mediada por sinais internos e externos que ativam genes específicos e a subsequente síntese de novas proteínas, as quais participam da execução do programa de morte (THOMPSON, 1995; BOLD *et al.*, 1997).

Durante este processo as células perdem o contato com as células vizinhas e apresenta tamanho reduzido e cromatina condensada. Além destas mudanças morfológicas, alterações bioquímicas são marcantes no processo de apoptose, já que este processo ativa endonucleases endógenas que degradam o DNA na região internucleossomal, originando fragmentos de 180 pares de bases, o que é considerado uma característica bioquímica marcante da apoptose (WYLLIE, 1980). Estes fragmentos são delimitados por uma membrana, formando os corpos apoptóticos.

A técnica utilizada para avaliação do Índice de Apoptose, descrita por McGahon *et al.* (1995), emprega em uma dada população celular uma coloração diferencial com laranja de acridina e brometo de etídio, para a identificação de quatro categorias celulares, determinadas em função de sua morfologia e coloração: células normais, apoptóticas com presença de corpúsculos apoptóticos e sem alteração de membrana (AI), apoptóticas tardias com presença de corpúsculos apoptóticos e com alteração de membrana (AT) e necróticas.

O laranja de acridina se intercala no DNA, proporcionando uma coloração verde. Este corante também se liga ao RNA, mas como não se intercala, cora-o de vermelho-alaranjado. O brometo de etídio penetra somente em células mortas. Este corante também se intercala no DNA, dando uma aparência laranja, mas se liga fracamente ao RNA, o qual pode aparecer ligeiramente vermelho. Assim, células vivas com membrana intacta têm uma coloração verde uniforme em seu núcleo. Células em apoptose inicial com membrana intacta, mas com fragmentação de seu DNA, mostram uma coloração verde no núcleo e citoplasma,

sendo visível uma marginalização do seu conteúdo nuclear. Células em apoptose final apresentam áreas coradas em laranja tanto no citoplasma como nos locais onde a cromatina está condensada no núcleo, o que as distingue de células necróticas, que têm uma coloração alaranjada uniforme no núcleo.

### 3.8 RT-PCR EM TEMPO REAL

A PCR quantitativa é uma técnica estabelecida para a quantificação de mRNA de amostras biológicas (HUGGETT *et al.*, 2005). Este processo apresenta vários benefícios em relação aos métodos convencionais, tais como: alta sensibilidade, quantificação precisa e alta resolução. Além disso, a detecção da amplificação na técnica de PCR em tempo real é realizada durante as fases adiantadas da reação (fase exponencial), o que fornece uma vantagem distinta da PCR tradicional, onde a detecção da amplificação é realizada na fase final ou no valor limite da reação, e ainda requer a detecção em gel, após eletroforese (NOVAIS *et al.*, 2004).

A denominação da técnica vem de “reação da transcriptase reversa” (RT), na qual o RNA é transcrito em um cDNA, adequado para a quantificação. A expressão “real time” se refere ao princípio da técnica - monitoramento constante do acúmulo do produto da PCR para estimar a quantidade inicial de mRNA (SKRZYPSKI, 2008).

Segundo OHL *et al.* (2005), a estratégia de análise geralmente utilizada para avaliar os dados de RTPCR é a quantificação relativa. Nesse tipo de análise a expressão de um gene alvo é relacionada com a de um gene estavelmente expresso, como os genes constitutivos, simultaneamente determinados na mesma amostra. Alguns critérios devem ser levados em conta para um gene ser considerado adequado como referência, como por exemplo, ser constitutivo, não regulado e ter expressão estável nas amostras investigadas. Portanto, nesta técnica, a seleção dos genes de referência é um pré requisito importante para o controle da variabilidade entre amostras.

De acordo com Pfaffl (2001) o cálculo da expressão relativa deve levar em consideração os valores de Ct (*Cycle Threshold*) e E (eficiência da reação),

pois diferenças mínimas observadas nessas variáveis em uma reação podem culminar em uma diferença significativa de quantidade de produto final da reação. O valor de Ct corresponde ao ciclo no qual a fluorescência aumenta sensivelmente, sendo então considerada a primeira fluorescência detectada. Este valor serve como ferramenta para calcular a quantidade inicial de cDNA em cada amostra. Segundo Scheffe *et al.* (2006), a natureza exponencial da cinética de reação RT-PCR faz com que pequenas variações nos valores de Ct produzam grandes efeitos no cálculo da razão da expressão gênica.

## REFERÊNCIAS

- AGUERO, F; BULNES, C; DURAND, R. et al. Ensayo de irritabilidad vaginal a um producto natural, obtenido a partir de *Rhizophora mangle* L. destinado al tratamiento de infecciones uterinas. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 4, n. 6, 2005.
- ARMSTRONG, R. N. Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferase. **Chemical Research Toxicology**. v. 10, p. 2–18, 1997.
- BELLINI, M.; ANGELI, L.; MATUO, R. et al. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-K1 and HTC cells. **Toxicology in Vitro**. v. 20, p. 355-360, 2006.
- BERENQUER, B.; SÁNCHEZ, A. Q.; LÓPEZ-BARREIRO, M. et al. Protective and antioxidante effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID – induced gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 194-200, 2006.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 303, p. 474–482, 1993.
- BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology Therapeutics**. v. 90, p.157– 177, 2001.
- BRIGELIUS-FLOHE, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 27, p. 951– 65, 1999.
- DE ARMAS, E. Y.; SARRACENT, E.; MARRERO, O. et al. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract (RMABE) in the treatment of aphthous ulcers: A pilot study. **Medical Research and Opinion**. v. 21, p. 1711-1715, 2005.
- DIZDARAGLU, M. Chemical determination of free radical-induced damage do DNA. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 10, p. 225-242, 1991.
- DUFRESNA, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 12, p. 404-421, 2001.
- DUY; LOU, H. Catechin and proanthocyanidin B4 from grape seeds prevent doxorubicin-induced toxicity in cardiomyocytes. **European Journal of Pharmacology**. v. 591, p. 96–101, 2008.

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

FIGUEROA, O; FIGUEREDO, J. M.; RODRÍGUEZ, A. et al. Efecto de una solución de Mangle rojo en la cicatrización de heridas experimentales em conejos. **Revista de Salud Animal**. v.17, p. 96-99, 1995.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v. 408, p. 239- 247, 2000.

FISCHER, P. M.; LANE, D. P. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anticancer therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**. v. 7, p. 1213– 1245, 2000.

FRESHNEY, I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 5.ed. John Wiley & Sons, 2005.

GAD, S. C. Primary hepatocyte culture as an *in vitro* toxicologic system for the liver. In: GAD, S. C. **In Vitro Toxicology**. 2.ed. New York: Taylor & Francis, 2000. cap. 11

GAMET-PAYRASTRE, L.; AGULLO, G.; MANENTI, S. et al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem Pharmacol**. v.53, 1649– 1657, 1997.

GUTIÉRREZ, M.; MELCHOR, G.; FIGUEREDO, J. M. Evaluación de la eficacia del CIKRON como preventivo de infecciones umbilicales de ternero neonatos. **Revista de Salud Animal**. v. 23, p. 32-36, 2001.

GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in diseases processes: a compilation of cause and consequence. **Free Radical Research Communications**, v.19, p. 141– 58, 1993.

HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M.; JONES, A. G. et al. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 46, p. 1887-1892, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.,M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford7 Clarendon Press; 1999.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human diseases: a general introduction. **Nutrition Reviews**, v. 55, p. 44–52, 1997.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**. v. 355, p.1179, 2000.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanism and measurement in mammalian systems. **Febs**. v. 281, p. 9-19, 1992.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutation Research**. v. 275, p. 257-266, 1992.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**. v. 59, p. 205-215, 1996.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridina orange – coated slides. **Mutation Research**. v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990.

HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 273–300, 1999.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**. p. 1–6, 2005.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. Environmental desmutagens and antimutagens In: KLEKOWSKI, E. J. (Ed.), **Environmental Mutagenesis and Plant Biology**, Praeger, New York, pp. 137-151, 1982.

KEHRER, J. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 23, p. 21 – 48, 1993.

KUHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 33, p. 154–72, 2002.

LAUGHTON, M. J.; EVANS, P. J.; MORONEY, M. A. et al. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. **Biochemical Pharmacology**. v. 42, p. 1673– 1681, 1991.

LEWIN, B. **Genes IX**. 9.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 912

LIU, Y; PETERSON, D. A.; KIMURA, H. et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal Neurochemistry**. v. 69, p. 581–593, 1997.

LOPACZYNSKI, W.; STEVEN, H. Zeisel Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutrition Research**, v. 21, p. 295–307, 2001.

MASELLA, R. T.; DI BENEDETTO, R.; VARI, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577–586, 2005.

MCCALL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p.1034 –53, 1999.

MELLO FILHO, A. C.; MENEGHINI, R. *In vivo* formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 781, p. 56-63, 1984.

MELO, P. S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal**, v. 36, p. 639-543, 2000.

MORA, A; PAYA, M.; RIOS, J. L. et al. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**. v. 40, p. 793, 1990.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MUELLER, S. O.; SIMON, S.; CHAE, K. et al. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. **Society of Toxicology**. v. 80, p. 14–25, 2004.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

OECD. Guideline for the testing of chemicals draft proposal for a new guideline 487: **In vitro Micronucleus Test**. Draft Guideline,. june 14. 2004.

OHL, F.; JUNG, M.; XU, C. et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue; which reference gene should be selected for normalization? **Journal of Molecular Medicine**. v. 83, n. 12, p. 1014–1024, 2005.

- OLIVEIRA, R.; MATUO, R.; SILVA, A. et al. Protective effect of B-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 21, pp. 41-52, 2007.
- PAIVA, S. R.; HERINGER, A. P.; FIGUEIREDO, M. R. et al. Taninos condensados de espécies de *Plumbaginaceae*. **Floresta e Ambiente**, v. 9, n. 1, p.153 – 157, 2002.
- PERERA, L. M. S.; RUEDAS, D. B. C.; GOMEZ, B. C. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 1–3, 2001.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29, p. 2004-2007, 2001.
- PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- RABELLO-GAY, M. N. Teste de micronúcleo em medula óssea. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto – SP: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p. 83-90.
- RATTY, A. K.; DAS, N. P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**. v. 39, p.69-79, 1988.
- ROSEN, G. M.; POU, S.; RAMOS, C. L. et al. BRITIGAN, B. E. Free radicals and phagocytic cells. **FASEB J**. v. 9, p. 200–9, 1995.
- SÁNCHEZ, J.; MELCHOR, G.; MARTÍNEZ, G. et al. Protective effect of *Rhizophora mangle* bark on lipid peroxidation and erythrocyte hemolysis. **Pharmacognosy Magazine**, v. 3, p. 101-104, 2005
- SÁNCHEZ, J.; MELCHOR, G.; MARTÍNEZ, G. et al. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 141-143, 2006.
- SÁNCHEZ, J.; MELCHOR, G.; MARTÍNEZ, G. et al. Protective effect of *Rhizophora mangle* bark on lipid peroxidation and erythrocyte hemolysis. **Pharmacognosy Magazine**, v. 1, p. 101-105, 2005.
- SANCHEZ, LUZ M.; MELCHOR, G.; ALVAREZ, S. et al. Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. **Revista de Salud Animal**, v. 20, n. 1, p. 69-72, 1998.

SCHEWE, T.; SADIK, C.; KLOTZ, L-O. et al. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 382, p. 1687–1696, 2001.

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

SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A. P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. **Nature**, v. 349, p. 431-434, 1991.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SKRZYPSKI, M. Quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in translational oncology: Lung cancer perspective. **Lung Cancer**, v. 59, p. 147-154, 2008.

SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C.; WILLIAMS, R. J. Modulation of pro-survival Akt/PKB and ERK1/2 signalling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, p. 34783– 34793, 2003.

SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis**, v.21, p. 387-395, 2000.

TAKARA, K.; KUNIYOSHI, A.; WADA, K. et al. Antioxidative flavan-3-ol glycosides from stems of *Rhizophora stylosa*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 72, n. 8, p. 2191-2194, 2008.

TERAO, J.; PISKULA, M.; YAO, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, p.278, 1994.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37– 56, 2004.

VAN HOORN, D. E. C.; NIJVELDT, R. J.; VAN LEEUWEN, P. A. M. et al. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 451, p. 111 – 118, 2002.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A.; SERRY, M. M. et al. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p.2008, 1995.

VISIOLI, F.; KEANEY, J. R. J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 409, 2000.

WANG, C. C; CHEN, L. G.; YANG, L. L. Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea hyssopifolia*. **Cancer Letters**, v. 140, p. 195 – 200, 1999

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F. et al. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research**. v. 238, p. 57-85,1990.

WAY, T. D.; KAO, M. C.; LIN, J. K. Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 145–52, 2005.

YOKOZAWA, T.; CHEN, P. C.; DONG, E. Et al. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picryldrazyl radical. **Biochemical Pharmacology**. v. 56, p. 213 – 222, 1998.

## ARTIGO A

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO EXTRATO  
AQUOSO DE *RHIZOPHORA MANGLE* L. *IN VIVO* E *IN VITRO***

Malini, M.<sup>a\*</sup>, Serpeloni, J. M.<sup>a</sup>, Figueiredo, S. G.<sup>b</sup>, Cólus, I. M. S.<sup>a</sup>, Matsumoto, S. T.<sup>c</sup>.

**Resumo**

*Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae), uma espécie nativa de manguezal, é conhecida popularmente como mangue-vermelho, devido à grande quantidade de taninos concentrados, principalmente, em sua casca. O extrato da casca de *R. mangle* é amplamente utilizado na medicina popular como antisséptico, antifúngico e cicatrizante. No município de Vitória, Estado do Espírito Santo, Brasil, este extrato é utilizado pela Associação das Paneleiras como matéria-prima para a confecção de tradicionais panelas de barro. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o extrato aquoso da casca de *R. mangle* quanto à sua possível atividade mutagênica e pró-apoptótica *in vivo*, por meio do teste do micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos e as atividades citotóxica, mutagênica e pró-apoptótica em cultura de células de hepatoma de *Rattus norvegicus*. Os testes *in vivo* revelaram ausência de atividade mutagênica do extrato vegetal nas três concentrações avaliadas (70, 140 e 280 mg/kg pc). Os resultados *in vitro* mostraram ausência de citotoxicidade e mutagenicidade de todas as concentrações avaliadas (4,37 a 560 µg/mL) do extrato aquoso da casca de *R. mangle*. Os resultados do presente estudo permitem a recomendação deste extrato para fins medicinais e artesanais. A atividade pró-apoptótica observada para a concentração de 35,0 µg/mL em células tumorais serve de subsídio para pesquisas futuras que visem investigar uma possível atividade quimioterápica deste extrato. São necessários estudos que visem elucidar o modo pelo qual este processo está ocorrendo nas células, o que servirá para confirmar a atividade quimioterápica deste extrato.

---

<sup>a\*</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380, CEP86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. +55.43.3331-4608. e-mail: maressamalini@yahoo.com.br

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380, CEP86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Nº. 1468, CEP29040-090, Maruípe, Vitória, ES, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, CEP29075-910, Goiabeiras, Vitória, ES, Brasil.

**Palavras-chave:** Mutagenicidade. Camundongos. Células. HTC. *Rhizophora mangle*, micronúcleo.

## 1 Introdução

Aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis no mercado foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais, especialmente de plantas superiores (CALIXTO, 2001). Assim, pesquisas que investigam e identificam compostos bioativos em plantas são de grande importância para a indústria farmacêutica, que busca agentes eficazes no processo de cura de diversas doenças graves e complexas como o câncer (CASTRO *et al.*, 2004).

Camundongos são amplamente adotados como modelo experimental *in vivo* para se avaliar o metabolismo de compostos químicos devido à grande similaridade com os seres humanos quanto aos mecanismos fisiológicos e de metabolização de xenobióticos (HAYASHI *et al.*, 1994; HARTMANN *et al.*, 2003), o que torna interessante seu emprego em investigações biológicas (JANSSEN *et al.*, 2002). Entre os testes aplicados em camundongos para a detecção de mutagenicidade, está o teste do micronúcleo, internacionalmente aceito para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial, entre eles, os fitoterápicos (TAKAHASHI *et al.*, 2007).

O Brasil é um país que apresenta enorme diversidade biológica, o que confere a ele um grande potencial para estudos no campo da química de produtos naturais. O uso de plantas medicinais no Brasil é muito comum e, às vezes, consiste na única alternativa para a população de baixa renda curar doenças (DIEGUES, 2000). A floresta amazônica é uma grande fonte de compostos ativos para o uso na indústria farmacêutica, entretanto, não é a única fonte em se tratando de plantas medicinais brasileiras. Nos manguezais brasileiros encontra-se a espécie *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae), uma planta nativa deste ecossistema, que apresenta uma grande quantidade de taninos, que estão concentrados, principalmente, em sua casca (SÁNCHEZ *et al.*, 1998). PERERA *et al.* (2001), FERNANDEZ *et al.* (2002), BERENQUER *et al.* (2006) e SÁNCHEZ *et al.* (2009), relataram a eficiência do extrato de *R. mangle* no tratamento de feridas abertas e úlceras gástricas induzidas em ratos. De acordo com ARMAS (2005), este extrato apresenta grande eficiência no tratamento contra úlcera oral, uma vez que foi capaz

de reduzir de forma significativa o tempo de cicatrização, sem apresentar efeitos colaterais. Além da atividade antiulcerogênica, já foi relatado para este mesmo extrato efeito antisséptico *in vivo* e *in vitro* (MELCHOR, 2001). O forte potencial deste extrato frente a patologias que acometem a pele e a sua grande eficácia contra micro-organismos patogênicos, levou ao desenvolvimento de duas formulações à base deste extrato para uso veterinário e humano. Estas formulações - Cikron® e Udertan®- são uma grande alternativa terapêutica para a saúde pública e medicina veterinária cubana.

Além de sua aplicação na indústria farmacêutica e na medicina popular, o extrato aquoso da casca de *R. mangle* também apresenta grande aplicabilidade para fins artesanais, sendo utilizado nos processos de curtimento e impermeabilização durante a fabricação de panela de barro pela Associação das Paneleiras do Município de Vitória/ES/Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de *R. Mangle* e Obtenção do Extrato

A casca da *R. mangle* foi coletada em maio de 2009 no manguezal que margeia a localidade de Goiabeiras/ES/Brasil. Um exemplar autêntico está depositado no herbário da Universidade Federal do Espírito Santo sob o registro número 673. Para o preparo do extrato aquoso foi seguido o procedimento realizado pela Associação das Paneleiras de Vitória/ES, macerando-se 300 gramas de casca da planta em 900mL de água destilada por um período de 72 horas. Posteriormente o extrato foi liofilizado para ser utilizado nos experimentos.

### 2.2 Animais

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos Swiss albinos *Mus musculus*, pesando  $30 \pm 2$  g, com idade entre 8-12 semanas, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina/PR. Todos os animais foram aclimatados por sete dias a temperatura controlada (23° C), em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram mantidos individualmente em caixas de polietileno com tampa grade, de acordo com as recomendações do *Canadian Council Animal Care* (OLFERT *et al.*, 1993). Para cada tratamento foram

utilizados grupos contendo 6 animais, sendo 3 fêmeas e 3 machos. As soluções foram administradas via gavagem, na proporção de 0,1 mL para cada 10 g de peso corpóreo dos animais. Os animais foram pesados diariamente e foram disponibilizados água e alimento *ad libitum* durante todo o experimento. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Espírito Santo, através do parecer 008/2008.

### 2.3 Cultura de Células e Condições de Cultivo

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC) gentilmente cedidas ao nosso laboratório pelo Prof. Mantovani da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As células foram cultivadas em frascos de cultura (25cm<sup>2</sup>) na forma de monocamada, contendo meio DMEM/HAMF12 (Invitrogen, Life Technologies), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco) e mantidas em estufa tipo BOD a 36°C.

As concentrações do extrato utilizadas nas culturas de células HTC para os experimentos de antimutagenicidade foram selecionadas por meio de ensaios prévios de citotoxicidade (MTT) e de mutagenicidade (dados não apresentados).

### 2.4 Agente Indutor de Danos no DNA

O agente indutor de danos no DNA utilizado nos experimentos de antimutagenicidade em culturas de células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC) foi a Doxorubicina - DXR (Sigma), na concentração de 0,75 µg/mL. Esta droga intercala-se na molécula de DNA, inibindo a síntese de RNA e DNA e a síntese protéica, fragmentando o DNA e inibindo seu reparo, com consequente morte celular (BRAUNWALD *et al.*, 1999; TOKUDOME *et al.*, 2000; TALLARICO *et al.*, 2003).

### 2.5 Ensaio In Vitro

#### 2.5.1 Ensaio de Viabilidade Celular - MTT

O ensaio do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por MOSMANN (1983). Os experimentos foram conduzidos em cultura de células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), onde foram avaliadas nove concentrações crescentes do extrato aquoso de *R. mangle* (4,37; 8,75; 17,50; 28,00; 35; 70; 140; 280 e 560 µg/mL). As células foram cultivadas em placas com 96 poços contendo meio F12/DMEN (Invitrogen), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco-Invitrogen) e mantidas a 36°C em estufa tipo BOD. Foram semeadas  $2 \times 10^4$  células/poço, que foram expostas a diferentes concentrações do extrato por 24 horas. Ao final deste período, as células foram incubadas com o sal MTT por 4 horas, seguido de leitura no espectrofotômetro a 550 nm (Eppendorf). O experimento foi realizado em triplicata.

### 2.5.2 Teste do Micronúcleo

A mutagenicidade *in vitro* foi avaliada pelo ensaio do Micronúcleo (MN) com bloqueio de citocinese de acordo com o protocolo de FENECH; MORLEY (1985). Foram utilizadas células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC) gentilmente cedidas pelo Prof. Mantovani da Universidade Estadual de Londrina (UEL). O cultivo foi realizado em frascos de cultura (25 cm<sup>2</sup>) na forma de monocamada, em meio D-MEM/HAM F12, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco).

Foram semeadas  $2 \times 10^4$  células em cada frasco de cultivo, que permaneceram por um período de 24 horas na estufa BOD a 36°C para estabilização. Em seguida cada frasco recebeu uma das diferentes concentrações de extrato de *R. mangle*, previamente escolhidas a partir do ensaio de MTT (17,5; 28,0 e 35,0 µg/mL). O grupo controle negativo foi constituído por uma cultura tratada com PBS (pH 7,4) e o controle-positivo com o agente antineoplásico Doxorubicina (Sigma) na concentração de 0,75 µg/mL.

Decorrido o tempo de 24 horas de tratamento, os meios de cultura foram descartados, os frascos lavados por duas vezes com PBS e adicionados meio de cultura e 50 µL de citocalasina B (Invitrogen). As células HTC permaneceram sob tratamento com citocalasina por 30 horas para permitir a formação de células binucleadas. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS, desprendidas

com uma solução de tripsina-EDTA 0,0025% (Gibco) e inativadas com meio de cultura. Em seguida as células foram hipotonizadas com citrato de sódio (1%), fixadas com solução 1 metanol : 3 ácido acético. Após a confecção das lâminas, estas foram coradas com solução de Giemsa (Merck) 5%. Para cada tratamento foram analisadas 1000 células em microscópio Nikon com objetiva de 100X e anotados o número de células micronucleadas e o número de MN por célula. O experimento foi realizado em triplicata.

### 2.5.3 Avaliação do Índice de Apoptose

A avaliação da apoptose foi realizada pelo método de coloração diferencial com acridina orange e brometo de etídeo de acordo com McGahon *et al.* 1995. As lâminas foram preparadas utilizando-se 25 µL da suspensão celular obtida no teste do micronúcleo antes da hipotonização e 1 µL de corante (100 µg/mL de laranja de acridina e 100 µg/mL de brometo de etídeo). Esta mistura foi aplicada em uma lâmina limpa e seca e coberta com lamínula. Foram analisadas 200 células por repetição experimental com microscópio Nikon, com filtro para fluorescência (515 – 560 nm) e objetiva de 60X. O experimento foi feito em triplicata.

A porcentagem de apoptose foi calculada de acordo com a fórmula:

**Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Onde

AI = células em apoptose inicial

AT = células em apoptose tardia

## 2.6 Ensaio In Vivo

### 2.6.1 Determinação da Dose Letal Mediana ( $DL_{50}$ )

A Dose Letal Mediana ( $DL_{50}$ ), do extrato aquoso da casca de *R. mangle* para camundongos Swiss albinos *Mus musculus* foi determinada por meio de injeção intraperitoneal, sob dose única. Os animais foram distribuídos em 9 grupos de 6 animais: um grupo controle negativo (não exposto) e oito grupos de animais

expostos a diferentes doses de *R. mangle* (17,5; 35; 70; 140; 280; 370; 460 e 560 mg/kg). A taxa de sobrevivência dos animais foi observada até 24 horas após o tratamento com o extrato.

### 2.6.2 Teste do Micronúcleo

Para os ensaios de mutagenicidade foram avaliadas três doses do extrato de *R. mangle*, escolhidas após a determinação da DL<sub>50</sub>. Foram utilizados 5 grupos de 6 animais, sendo os três primeiros grupos submetidos ao tratamento com os extratos (70, 140 e 280 mg/kg pc), via gavagem; o quarto grupo foi tratado com água destilada (controle negativo) e o quinto foi tratado com injeção intraperitoneal de Doxorubicina na dose de 20 mg/kg pc (controle positivo).

Amostras de sangue da cauda (aproximadamente 5µL) de cada animal foram coletadas de todos os camundongos com o auxílio de uma agulha tipo insulina antes de receberem o tratamento (T<sub>0</sub> – controle interno), após 24 horas de tratamento (T<sub>1</sub> – tratamento agudo), após 120 horas (5 dias) de tratamento (T<sub>2</sub> – tratamento subagudo) e após 14 dias de tratamento (T<sub>3</sub> – tratamento subagudo) e depositados no centro de uma lâmina previamente preparada com 10 µL de laranja de acridina, de acordo com a metodologia descrita por HAYASHI *et al.* (1990). Ao final dos experimentos todos os animais foram anestesiados e sofreram eutanásia por deslocamento cervical.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488nm) e filtro amarelo e para cada lâmina foram analisados 1000 reticulócitos, anotando-se a frequência de reticulócitos micronucleados de acordo com os critérios estabelecidos por HUBER *et al.* (1983) e TITENKO – HOLLAND *et al.* (1997).

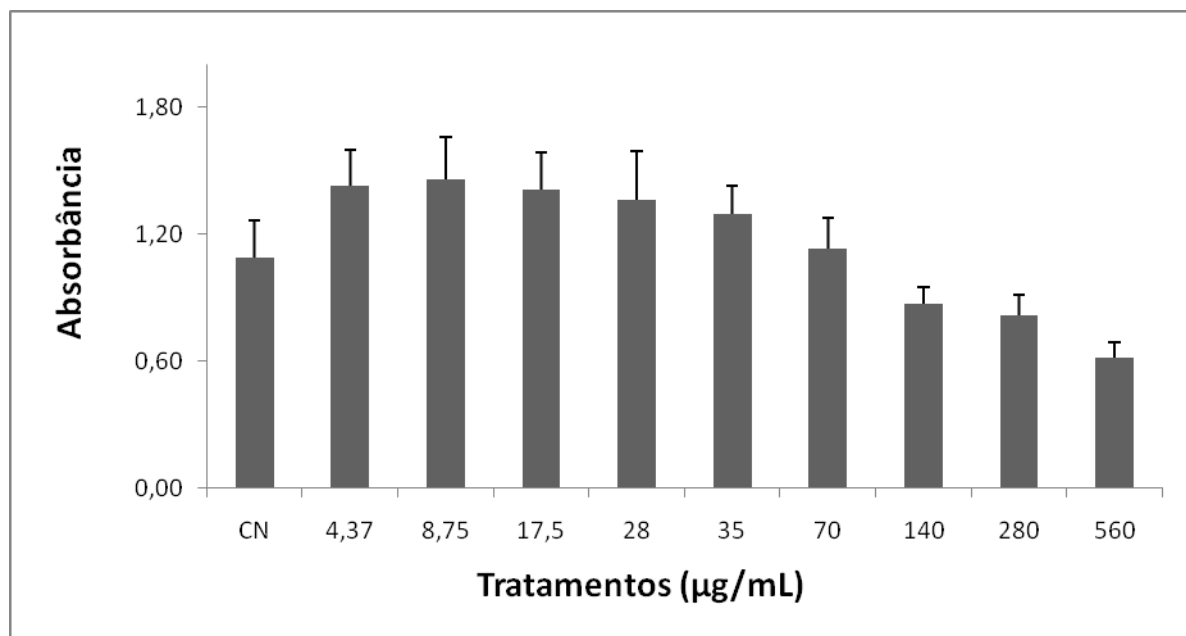
### 2.7 Análise Estatística

As médias obtidas para cada tratamento nos testes de citotoxicidade, apoptose e micronúcleo *in vitro* e *in vivo* foram calculadas a partir de três experimentos independentes e submetidas à análise de variância (ANOVA) (p<0,05) seguida pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com a ajuda do Programa Estatístico GraphPad InStat, versão 3.02.

### 3 Resultados

#### 3.1 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade (MTT) revelou que, em todas as nove concentrações do extrato de *R. mangle* avaliadas, houve crescimento celular semelhante ao observado no grupo controle negativo após 24 de tratamento, indicando ausência de efeito citotóxico (Figura 1).



**Figura 1** – Absorbâncias (médias e desvios padrões) obtidos no ensaio do MTT após tratamento de 24 horas das células HTC com diferentes concentrações do extrato de *R. mangle*.  
CN: controle negativo

#### 3.2 Mutagenicidade In Vitro

O teste do MN com bloqueio de citocinese em cultura de células HTC mostrou ausência de mutagenicidade das três concentrações avaliadas (17,5; 28,0 e 35,0 µg/mL) (Tabela 01).

**Tabela 1** – Freqüências de micronúcleos obtidas em três experimentos independentes em culturas de células HTC submetidas ao tratamento com extrato aquoso de *R. mangle*.

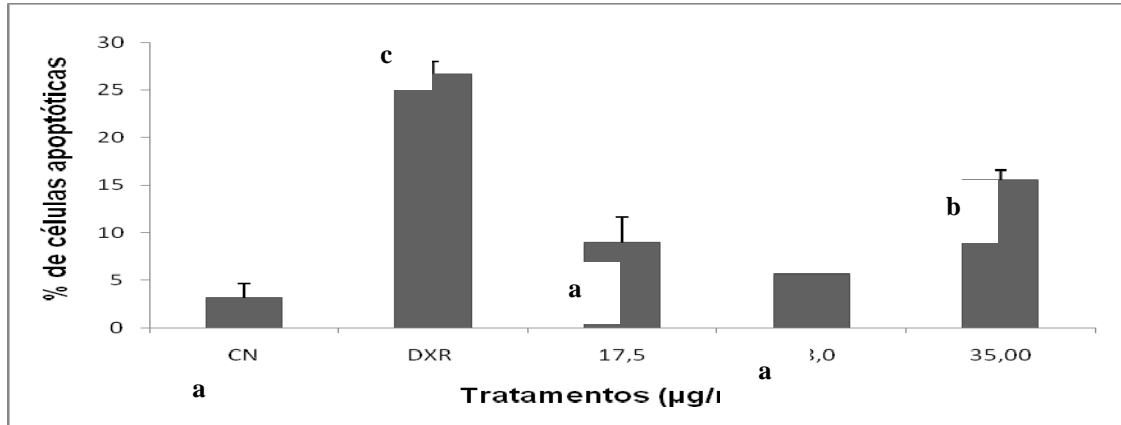
TRATAMENTOS (µg/mL)	Freqüências de células com MN (1000 células/repetição experimental)			
	Experimentos			X ± DP
	I	II	III	
Controle negativo (PBS)	0,0	1,0	2,0	1,00 ± 1,00
<b>Doxorrubicina</b>				
<b>0,75</b>	66	59	61	62,0 ± 3,61*
<b><i>R. mangle</i></b>				
<b>17,5</b>	3,0	1,0	0,0	1,33 ± 1,53
<b>28,0</b>	1,0	1,0	2,0	1,33 ± 0,58
<b>35,0</b>	1,0	2,0	2,0	1,67 ± 0,58

**X ± DP ; Média ±Desvio padrão**

\* Valor significativamente diferente dos demais ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

### 3.3 Índice de Apoptose

Na avaliação do índice de apoptose foi observado um aumento significativo da porcentagem de células apoptóticas em relação ao grupo controle negativo apenas nas culturas submetidas ao tratamento com o extrato a 35,0 µg/mL, como mostra a Figura 2.



**Figura 2** – Porcentagens médias de células apoptóticas observadas em culturas de células HTC tratadas com três diferentes concentrações do extrato de *R. mangle*  
 CN: controle negativo. DXR: Doxorubicina (7,5 µg/mL).  
 Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

### 3.4 Dose Letal Mediana (DL<sub>50</sub>)

O ensaio de DL<sub>50</sub>, realizado com um grupo de seis camundongos Swiss albinos *Mus musculus*, mostrou que a dose letal capaz de matar 50% da população de camundongos foi de 560 mg/kg pc.

### 3.5 Mutagenicidade In Vivo

O teste do Micronúcleo *in vivo* revelou ausência de atividade mutagênica do extrato de *R. mangle* nas três doses avaliadas (70, 140 e 280 mg/kg. pc). Tanto no tratamento agudo (T<sub>1</sub>) como nos tratamentos subagudos (T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>) as três doses do extrato não induziram micronúcleos, pois as frequências de reticulócitos micronucleados (MNRETS) não diferiram significativamente da frequência observada para o grupo controle negativo (Tabela 02).

O peso corpóreo dos camundongos tratados com as três concentrações do extrato de *R. mangue* não apresentou diferenças significativas em condições aguda (T<sub>1</sub>) e subagudas (T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>) quando comparado com o grupo controle negativo (T<sub>0</sub>) (dados não apresentados).

**Tabela 2** – Valores médios de reticulócitos micronucleados (MNRETs) do sangue periférico de camundongos Swiss albinos submetidos a diferentes tratamentos com diferentes concentrações do extrato aquoso de *R. mangle*.

TRATAMENTOS (mg/ Kg p.c.)	TEMPO DE TRATAMENTO (Dias)			
	T <sub>0</sub> (0)	T <sub>1</sub> (1)	T <sub>2</sub> (5)	T <sub>3</sub> (14)
	MNRETs (X ± DP)	MNRETs (X ± DP)	MNRETs (X ± DP)	MNRETs (X ± DP)
Controle (Água)	1,33±0,52	1,67±1,21	1,50±0,84	1,00±0,63
Doxorrubicina				
20	1,17±0,98	13,67±1,75*	-	-
<i>R. mangle</i>				
70	1,50±1,22	1,00±0,63	0,83±0,41	1,83±0,75
140	0,83±0,41	2,17±1,33	1,50±0,84	0,67±0,52
280	1,17±0,41	0,67±0,52	0,60±0,55	1,17±0,41

T<sub>0</sub> - Controle interno (água). T<sub>1</sub> – Tratamento agudo. T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> – Tratamentos sub-agudos.

X ± DP: Média ± desvio padrão

\*Valor (dentro da coluna) significativamente diferente dos demais ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey

#### 4 Discussão

O uso de espécies vegetais para fins de tratamento e cura de doenças e sintomas, remonta ao início da civilização, desde o momento em que o homem começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação destes recursos para seu próprio benefício. Atualmente a natureza continua a ser uma grande fonte de medicamentos para a humanidade. Nos últimos 20 anos o interesse pelas plantas medicinais tem aumentado o volume de investigações científicas sobre seus efeitos biológicos em seres humanos e em animais (VEIGA JR. *et al.*, 2005).

Estudos com o extrato bruto e frações obtidas da casca de *R. mangle* vêm despertando interesse de alguns pesquisadores devido ao alto potencial terapêutico atribuído a esta planta. Tais estudos revelam atividade antioxidante (SÁNCHEZ *et al.*, 2005), bactericida (MELCHOR *et al.*, 2001), anti-séptica (FERNANDEZ *et al.*, 2002) e anti-úlceras (PERERA *et al.*, 2001; BERENQUER *et al.*, 2006).

A atividade biológica do extrato aquoso de *R. mangle* é atribuída, principalmente, à presença de grande quantidade de taninos, aproximadamente 49,8%, confirmada por meio da triagem farmacognóstica e doseamento em estudos

anteriores do nosso grupo de pesquisa (MALINI *et al.*, 2010). Estes dados são concordantes com os apresentados por SÁNCHEZ (1998), que detectou a presença de 54% de taninos em um extrato aquoso de *R. mangle*. SÁNCHEZ *et al.* (2007) também realizaram estudos mais complexos de caracterização química deste extrato por meio de análises gravimétricas, colorimétricas e de cromatografia de fases gasosa e líquida de alta eficiência (HPLC), detectando a presença de epicatequina, catequina, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido elágico e fitoesteróis (estigmasterol, p-sitosterol e campe-esteróis).

A literatura tem atribuído a estes compostos polifenólicos propriedades citotóxicas, antioxidantes, antimutagênicas, anticarcinogênicas e efeitos de modulação da atividade de diversas enzimas celulares (MIDDLETON *et al.*, 2000; SPENCER *et al.*, 2001; FERGUSON, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2004;). De acordo com CZECZOT *et al.* (1990), dos mais de 8000 polifenóis existentes, menos de 200 foram avaliados quanto aos seus efeitos mutagênicos. A maioria dos compostos testados não apresenta efeito mutagênico ou é considerado fracamente mutagênico. Essa ausência de mutagenicidade e alta capacidade antioxidante são bons indicativos para considerar estes compostos fortes candidatos a agentes quimioprotetores.

O ensaio do MTT (Mosman, 1983), foi empregado neste trabalho para a escolha de concentrações viáveis a serem utilizadas no teste do micronúcleo *in vitro*. Os resultados obtidos no estudo revelaram ausência de efeito citotóxico das nove concentrações do extrato de *R. mangle* avaliadas após 24 h de tratamento. Entretanto, a partir da concentração de 70 µg/mL houve uma tendência à citotoxicidade, o que justifica a utilização de três concentrações inferiores a esta nos ensaios *in vitro*. A diminuição da proliferação e viabilidade celulares promovida por concentrações mais elevadas do extrato de *R. mangle* pode estar relacionada ao efeito tóxico do extrato sobre o metabolismo das células HTC.

De acordo com RICHTER *et al.* (1995), a maioria dos polifenóis induz o processo de apoptose em pelo menos um tipo celular numa determinada concentração. Nossos dados indicam um aumento significativo da porcentagem de células apoptóticas nas culturas de células HTC submetidas ao tratamento com a concentração de 35.0 µg/mL em relação ao grupo controle negativo. Este potencial pró-apoptótico encontrado em nosso estudo corrobora os dados obtidos por WAY *et al.* (2005) em células das linhagens MCF-7, T47-D, MDA-MB-453, BT-474 e SKBR-

3; por MONASTERIO *et al.* (2004) nas células U937 e por SERGEEV *et al.* (2004), em células MCF-7. Estes autores descreveram a capacidade de compostos polifenólicos de interagirem com as vias caspase-dependentes, causando ativação do processo de apoptose nos tipos celulares estudados. Segundo WANG *et al.* (1999), a apoptose induzida por grupos polifenólicos parece ser estimulada pela liberação de citocromo-c para o citosol, seguida de ativação de pró caspase-9 através de um mecanismo dependente de caspase-3. SAKAGUCHI *et al.* (1998) sugerem que a indução de apoptose por polifenóis não depende apenas de sua estrutura, mas também do tipo celular avaliado, já que em seus estudos com ácido gálico sob condições-padrão de produção de ERO e sob a mesma concentração de cálcio, células HL-60, Hela e dRLh-84 mostraram respostas distintas de indução de morte celular.

No teste do MN *in vitro* foi observada ausência de mutagenicidade das três concentrações do extrato avaliadas em células HTC. Estes resultados são concordantes com aqueles publicados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (MALINI *et al.*, 2009), onde se avaliou este mesmo extrato na concentração de 17,5 µg/mL por meio do teste de MN em cultura de células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1). A ausência de mutagenicidade em células com sistema de metabolização (HTC) e em células sem capacidade de metabolização (CHO-K1) revela maior segurança para a utilização deste extrato como agente fitoterápico. SANYAL *et al.* (1997) demonstraram que a atividade mutagênica de compostos polifenólicos em células humanas metabolicamente competentes (HepG2) é baixa e acontece geralmente em uma escala de concentração mais elevada.

No presente trabalho os animais apresentaram, em média, peso corpóreo inicial de 30g, o qual não foi alterado em relação ao grupo negativo durante os experimentos, sugerindo que o extrato aquoso da casca de *R. mangle* não interfere no metabolismo normal dos animais.

Dados recentemente publicados por LÁZARO *et al.* (2010) mostraram que o extrato aquoso de *R. mangle* induz dano genotóxico em células germinativas de ratos submetidos a tratamento por três dias, mas não em um curto período de metabolização. Estes danos genotóxicos causados em condição de tratamento agudo nas células germinativas não foram observados no presente estudo em células somáticas de camundongos sob tratamentos agudo e sub agudo. Assim, podemos supor que, se o extrato produziu efeito genotóxico nas células

somáticas, estes não foram fixados em forma de mutações, pois as frequências de MN observadas nestas condições foram normais.

A baixa frequência de micronúcleos e a alta taxa de apoptose encontradas nas células HTC sugerem que há uma ligação entre a formação de MN e a apoptose. FENECH *et al.* (1998) e DECORDIER *et al.* (2002) sugerem que o processo apoptótico contribui para a eliminação de micronúcleos presentes nas células submetidas a um agente mutagênico, o que resulta, em algumas situações, em um resultado falso-negativo durante a avaliação de mutagenicidade.

Em suma, os resultados do presente estudo mostraram-se coerentes com a literatura descrita para este extrato e para compostos polifenólicos. Vale ressaltar que o potencial pró-apoptótico observado para a concentração de 35,0 µg/mL deve ser melhor investigado, até porque foi encontrado dentro do limiar de citotoxicidade aceita, como demonstrado no ensaio do MTT. São necessários estudos que visem elucidar o modo pelo qual este processo está ocorrendo nas células, o que servirá como subsídio para confirmar a atividade quimioterápica deste extrato, uma vez que ele foi capaz de induzir morte celular em células tumorais.

## Agradecimentos

Ao Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do município de Vitória (FACITEC) e ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro. À Capes pela bolsa de mestrado concedida a Malini, M.C. e ao CNPq pela bolsa PQ concedida a Cólus, I.M.S.

## Referências

ARGMANN, C. A.; CHAMBON, P.; AUWERX, J. Mouse phenogenomics: the fast track to “systems metabolism”. **Cell Metabolism**, v. 2. p. 349–360. 2005.

BERENQUER, B.; SÁNCHEZ, A. Q.; LÓPEZ-BARREIRO, M. et al. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID – induced gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 194-200, 2006.

BOONE, C. W.; KELLOFF, G. J.; MALONE, W. E. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. **Cancer Research**, v. 50. p. 2–9, 1990.

CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Santa Catarina: Argos, 2001. p. 84-85.

CASTRO, H. G. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais**: metabólitos secundários. 2.ed. Viçosa/MG: Editora Viçosa, 2004.

CZECZOT, H.; TUDEK, B.; KUSZTELAK, J. et al. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. **Mutatat Research**, v. 240, p. 209–216, 1990.

DE ARMAS, E. Y.; SARRACENT, E.; MARRERO, O. et al. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract (RMABE) in the treatment of aphthous ulcers: A pilot study. **Medical Research and Opinion**, v. 21, n. 11. p. 1711-1715, 2005.

DECORDIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A. et al. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutatat Research**, v. 504, p. 137-148, 2001.

DIEGUES, A. C. Etnoconservação da natureza: enfoques alternativos. In: DIEGUES, A. C. (org.). **Etnoconservação**: novos rumos para a proteção da natureza nos trópicos. São Paulo: NAPAUB, SP, 2000. p. 1-46

FENECH, M.; MORLEY, A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147. p. 29-36, 1985.

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutation Research**, v. 404, p. 155-165, 1998.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89–111, 2001.

FERNANDEZ, O.; CAPDEVILA, J. Z.; DALLA, G. et al. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of pen surgical wounds. **Fitoterapia**, v. 73. p. 564-568. 2002.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45–51, 2003.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridina orange – coated slides. **Mutation Research**, v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T. et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 312, p. 293–304, 1994.

HUBER, R.; STRENG, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mutation Research**, v. 111. p. 185-193, 1983

JANSSEN, B. J. A.; SMITS, J. F. M. Autonomic control of blood pressure in mice: basic physiology and effects of genetic modification. **American Journal of Physiology**, v. 282, p. 1545-64, 2002.

LAZARO, C. Genotoxic assessment of aqueous extract of *R mangle*. (mangle rojo) by spermatozoa head assay. **Revista Cubana de Plantas Medicinales [online]**. v. 15, n. 1, 2010.

MALINI, M. ; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S. et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (*Rhizophoraceae*) using *in vivo* and *in vitro* test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1. p. 176-181, 2010.

MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. J.; BISSONNETTE, R. P. et al. The end of the (Cell) line: Methods for the study of apoptosis *In Vitro*. In: SCHURARTZ, L. M.; OSBOURNE, B. A. (eds.). **Methods in cell biology**. [s.l.]: Academic Press, 1995. v. 46, p. 153-184,

MELCHOR, G.; ARMENTEROS, M.; FERNÁNDEZ-LINARES, E. et al. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 689-691, 2001.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 651– 73, 2000.

MONASTERIO, A.; URDACI, M. C.; PINCHUK, I. V. et al. Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. **Nutrition and Cancer**, v. 50, p. 90 – 100, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

OLFERT, E. D.; CROSS, B. M.; MCWILLIAM, A. A. **Guide to the care and use of experimental animals**. 2nd ed., Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1993.

PERERA, L. M. S.; RUEDAS, D.; GÓMEZ, B. C. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. **Journal Ethnopharmacology**, v. 77, p. 1-3, 2001.

RICHTER, R.; EBERMANN, R.; MARIAN, B. Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signalling. **Nutrition and Cancer**, v. 34, p. 88–99, 1995

SAKAGUCHI, N.; INOUE, M. E. OGIHARA, Y. Reactive oxygen species and intracellular Ca<sup>2+</sup>, common signals for apoptosis induced by gallic acid. **Pharmacology Biochemistry**, v. 55 p.1973–1981, 1998.

SÁNCHEZ, L. M. P.; MANCEBO, B. D.; FAURE, R, G. et al. Validación de la técnica para la determinación de catequina en tabletas de *Rhizophora mangle* L. por CLAR. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 44, n. 1, 2010.

SÁNCHEZ, J.; MELCHOR, G.; MARTÍNEZ, G. et al. Protective effect of *R. mangle* bark on lipid peroxidation and erythrocyte hemolysis. **Pharmacognosy Magazine**, v. 1, n. 3, p. 101-105, 2005.

SANCHEZ, L. M.; MELCHOR, G.; ALVAREZ, S. et al. Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. **Revista de Salud Animal**, v. 20, n. 1, p. 69-72, 1998.

SÁNCHEZ, J.; FAURE, R.; MARTÍNEZ, G. et al. Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* (L.) y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas. **Revista de Salud Animal**, v. 31, n. 3, p. 170-175, 2009.

SANYAL, R.; DARROUDI, F.; PARZEFALL, W. et al. Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens. **Mutagenesis**, v. 12, p. 297–303, 1997.

SERGEEV, I. N. Genistein induces Ca<sup>2+</sup>-mediated, calpain/caspase-12- dependent apoptosis in breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 321, p. 462– 7, 2004

SPENCER, J. P. E.; SCHROETER, H.; KUHNLE, G. et al. Epicatechin and its in vivo metabolite 3VO-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3-activation. **Biochemical Journal**, v. 35, p. 493– 500, 2001.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P. et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, v. 338. p. 85-95. 1997.

VEIGA JUNIOR, A. C. P.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519–528, 2005.

WANG, C. C.; CHEN, L. G.; YANG, L. L. Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea hyssopifolia*. **Cancer Letters**, v. 140, p. 195 – 200, 1999.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 838– 49, 2004.

WAY, T. D.; KAO, M. C.; LIN, J. K. Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 145–52, 2005.

## ARTIGO B

**EFEITO ANTIMUTAGÊNICO, ATIVAÇÃO DE APOPTOSE E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES PROMOVIDOS PELO EXTRATO AQUOSO DE *RHIZOPHORA MANGLE* L. EM CÉLULAS DE HEPATOMA DE RATOS (HTC) *IN VITRO***

Malini, M.<sup>a</sup>, Nati, N.<sup>b</sup>, Sartori, D.<sup>a</sup>, Matsumoto, S. T.<sup>b</sup>, Cólus, I. M. S.<sup>a\*</sup>

**Resumo**

*Rhizophora mangle* L (Rhizophoraceae) é uma espécie nativa de manguezal e apresenta grande quantidade de polifenóis em sua casca. Seu extrato é utilizado na medicina popular como anti-séptico, antifúngico e cicatrizante. O presente trabalho teve como objetivos avaliar as atividades antimutagênica do extrato aquoso da casca de *R. mangle* L., bem como verificar a expressão de genes do estresse oxidativo (*SOD1*, *GPX1*), do biometabolismo de drogas (*GSTP1*) e de apoptose (*CASP9*) em células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC) *in vitro*. Três concentrações do extrato de *R. mangle* (17,5; 28,0; 35,0 µg/mL) foram avaliadas quanto às suas possíveis antimutagenicidades *in vitro*, utilizando o ensaio do micronúcleo. Foram empregados diferentes protocolos de tratamento em relação ao agente indutor de danos no DNA, Doxorubicina (DXR): pré-tratamento, pós-tratamento, tratamento simultâneo e tratamento simultâneo com incubação. Todas as concentrações do extrato avaliadas apresentaram efeito protetor em relação aos danos causados pela DXR (0,75µg/mL) nos quatro protocolos de tratamentos usados. As porcentagens de redução de danos calculadas permitem afirmar que o extrato exerceu forte proteção quando foram utilizados os protocolos de pré-tratamento e tratamento-simultâneo, indicando uma atividade desmutagênica. A obtenção de porcentagens de redução de danos entre 50% - 60% em tratamento simultâneo com pré-incubação leva à hipótese de que a atividade desmutagênica observada não ocorreu por interação extrato-DXR. Portanto, o extrato provavelmente atuou impedindo que a DXR atingisse a molécula de DNA. Para verificar a expressão gênica foi realizada a metodologia de RT-PCR em tempo real,

---

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>a\*</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil - +55.43.3371-4608 - e-mail: colus@sercomtel.com.br

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, CEP 29075-910, Goiabeiras, Vitória, ES, Brasil.

utilizando-se a concentração de 35,0 µg/mL de extrato para o tratamento das células HTC. Dados da análise transcricional mostraram aumento de expressão dos genes *SOD1*, *GSTP1* e *CASP9* em células tratadas com o extrato quando comparado com células não tratadas. Portanto, podemos inferir que a proteção encontrada em células HTC deve ser devido a ativação de enzimas antioxidantes em conjunto com aumento de detoxificação e ativação da apoptose pela via caspase-dependente que este extrato exerce sobre as células.

**Palavras-chave:** Antimutagenicidade. *Rhizophora mangle*. RT-PCR. Células de hepatoma de *Rattus norvegicus*.

## 1 Introdução

Os processos oxidativos existentes nas células dos organismos vivos estão diretamente ligados à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MATÉS *et al.*, 2000), que interfere na modificação de moléculas biológicas como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (FRIEDBERG, 2003). A manutenção da homeostase redox da célula é mantida pela presença de um sistema de defesa antioxidante enzimático realizado, principalmente, por enzimas do sistema endógeno como a catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase e por um sistema não – enzimático, que se refere aos antioxidantes de origem exógena. Tais substâncias inibem a peroxidação lipídica via sequestro de radicais livres, proporcionando uma proteção ao DNA (VINSON *et al.*, 2008). Neste sentido, os antioxidantes naturais têm sido alvo de diversos estudos, pois apresentam afinidade por espécies reativas de oxigênio (ERO), de forma a interromper sua formação ou sequestrarem as ERO, antes delas atuarem sobre a molécula de DNA (HANASAKI *et al.*, 1994).

Entre os antioxidantes de origem exógena destacam-se os compostos polifenólicos. Estes apresentam propriedades de regulação de algumas atividades celulares, tais como inibição ou redução de diferentes enzimas como telomerase, ciclo-oxigenases (LAUGHTON *et al.*, 1991), lipoxigenases (SCHEWE *et al.*, 2001), xantina oxidase (DEC *et al.*, 2002) e proteínas quinases (GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999); interação nas vias de transdução de sinais (SPENCER *et al.*, 2003); interação com receptores de células (MUELLER *et al.*, 2004); indução de enzimas detoxificantes (BIRT *et al.*, 2001), interferência junto às ciclinas na regulação

do ciclo celular (FISCHER *et al.*, 2000); interação com as vias caspases-dependentes (WAY *et al.*, 2005).

Jayaprakasha *et al.* (2007) mostraram que alguns antioxidantes naturais provenientes de plantas fenólicas apresentam atividades anti-inflamatória, antimutagênica, anticarcinogênica e antitumoral. Além disso, foi verificada uma associação entre dietas ricas em antioxidantes naturais e a quimioprevenção de importantes patologias como o câncer (LAMPE, 1999; SURH, 2002).

Nos manguezais brasileiros encontra-se a espécie *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae), uma planta nativa deste ecossistema, que apresenta um alto teor de compostos polifenólicos em sua casca (SÁNCHEZ *et al.*, 1998). Encontra-se distribuída ao longo das costas tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico (CHAPMAN, 1970). A casca das plantas da família Rhizophoraceae são utilizadas por diversas populações devido às suas atividades antioxidante, fungicida, antibacteriana, anti-inflamatória, antiulcerogênica e à sua eficácia na cicatrização de feridas abertas (TAKARA *et al.*, 2008).

Vários estudos procuraram comprovar e compreender a atividade antioxidante que o extrato da casca desta planta exerce em modelos *in vitro* e *in vivo*. Sanchez *et al.* (2006) comprovaram a sua capacidade de quelar íons de ferro; Berenguer *et al.* (2006), realizando estudos em ratos, sob condições de estresse oxidativo, detectaram que o tratamento com o extrato de *R. mangle* aumentou a atividade glutationala peroxidase e superóxido dismutase, enzimas responsáveis pela proteção contra danos oxidativos e hemólise. Sánchez *et al.* (2005), estudando danos oxidativos em eritrócitos de ratos, mostraram que o extrato de *R. mangle* foi capaz de inibir a peroxidação lipídica em células de cérebro e reduzir a indução de hemólise nos eritrócitos. Segundo os autores, esse mecanismo é devido à presença dos polifenóis no extrato, que protegem a hemólise, agindo diretamente na redução da formação de radicais livres ou, indiretamente, através da regeneração do  $\alpha$ -tocoferol e outros antioxidantes presentes na célula, doando hidrogênio ou como quelantes, neutralizando os metais redox  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , envolvidos na propagação do estresse oxidativo.

Neste sentido, extratos de plantas ricas em compostos antioxidantes são fortes candidatos a apresentarem atividade antimutagênica, que compreende agentes capazes de reduzir a frequência ou a taxa de mutações espontâneas ou induzidas, independente do mecanismo envolvido (WATERS *et al.*, 1990).

De acordo com Kada *et al.*(1982), os eventos antimutagênicos são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação em dois grupos. Os agentes desmutagênicos atuam inativando os compostos mutagênicos antes destes interagirem com o material genético química ou enzimaticamente, ou modulando o sistema de defesa antioxidante. Os agentes bio-antimutagênicos atuam sobre o mecanismo de reparo do DNA, resultando na diminuição da fixação das mutações.

O potencial antimutagênico de fitoquímicos presentes em extratos de plantas tem sido amplamente avaliado em células de mamíferos *in vitro*. Outra ferramenta importante a ser considerada como complemento para a avaliação de atividade dos produtos naturais são ensaios que tenham como foco a expressão gênica, já que a atividade destes compostos pode estar associada à modulação de diversos genes (MALIK; MAGNUSON, 2004).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos avaliar as atividades antimutagênica do extrato da casca de *R. mangle*, bem como quantificar a expressão dos genes superóxido dismutase (*SOD1*), glutathiona peroxidase (*GPX1*), glutathiona S- transferase P1 (*GSTP1*) e caspase-9 (*CASP9*) em células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC) cultivadas *in vitro*.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Coleta de R. Mangle e Obtenção do Extrato**

A casca de *R. mangle* foi coletada em maio de 2009, no manguezal que margeia a localidade de Goiabeiras/ES/Brasil. Um exemplar autêntico está depositado no herbário da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o registro número 673. Para o preparo do extrato aquoso foi seguido o procedimento realizado pela Associação das Paneleiras de Vitória/ES, macerando-se 300 gramas de casca da planta em 900 mL de água destilada por um período de 72 horas. Posteriormente o extrato foi liofilizado para ser utilizado nos experimentos.

### **2.2 Agente Indutor de Danos no DNA**

O agente indutor de danos no DNA utilizado nos experimentos de antimutagenicidade em culturas de células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC)

foi a Doxorubicina - DXR (Sigma), na concentração de 0,75 µg/mL. Esta droga intercala-se na molécula de DNA, inibindo a síntese de RNA e DNA e a síntese protéica, fragmentando o DNA e inibindo seu reparo, com conseqüente morte celular (BRAUNWALD *et al.*, 1999; TOKUDOME *et al.*, 2000; TALLARICO *et al.*, 2003).

### 2.3 Cultura de Células e Condições de Cultivo

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC) gentilmente cedidas ao nosso laboratório pelo Prof. Mantovani da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As células foram cultivadas em frascos de cultura (25cm<sup>2</sup>) na forma de monocamada, contendo meio DMEM/HAMF12 (Invitrogen, Life Technologies), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco) e mantidas em estufa tipo BOD a 36°C.

As concentrações do extrato utilizadas nas culturas de células HTC para os experimentos de antimutagenicidade foram selecionadas por meio de ensaios prévios de citotoxicidade (MTT) e de mutagenicidade (dados não apresentados).

### 2.4 Teste do Micronúcleo

A antimutagenicidade do extrato aquoso de *R. mangle* foi avaliada pelo ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio de citocinese, conforme descrito por Fenech e Morley (1985).

Foram semeadas aproximadamente  $2 \times 10^4$  células HTC em cada frasco de cultivo, que permaneceram por um período de 24 horas na estufa tipo BOD a 36°C para estabilização. Em seguida, os frascos foram submetidos a quatro protocolos experimentais de tratamento: A) Pré-tratamento: células HTC expostas ao extrato de *R. mangle* (17.5 µg/mL; 28.0 µg/mL e 35.0 µg/mL) por 24 h e posteriormente tratadas com o agente indutor DXR (0.75 µg/mL) por 24 h; B) Tratamento-simultâneo: células HTC expostas simultaneamente ao agente indutor de danos DXR (0,75 µg/mL) e ao extrato de *R. mangle* (17,5 µg/mL; 28,0 µg/mL e 35,0 µg/mL) por 24 horas; C) Tratamento-simultâneo incubado: agente indutor de danos (0.75 µg/mL) e extrato de *R. mangle* (17,5 µg/mL; 28,0 µg/mL e 35,0 µg/mL)

foram previamente incubados por uma hora e em seguida adicionados à cultura de células HTC por 24 h; D) Pós-tratamento: células HTC expostas ao agente indutor de danos DXR (0,75 µg/mL) por 24 h e posteriormente ao extrato de *R. mangle* (35,0 µg/mL) por 24 h. Como controle negativo foram utilizadas células HTC tratadas com solução tampão PBS (pH 7,4) e como controle positivo, células HTC expostas apenas à DXR (0,75 µg/mL) por 24 h.

Decorridos os tempos de cada tratamento, os meios de cultura foram descartados e os frascos lavados com PBS. Em seguida, foram adicionados meio de cultura DMEN/HAMF12 e 50 µL de citocalasina B 300 µg/mL (Sigma) por 30 h. Após este tempo as células foram lavadas com PBS, desprendidas com solução de tripsina-EDTA 0,0025% (Gibco), que foi inativada com meio de cultura completo. Posteriormente, as células foram hipotonizadas com citrato de sódio (1%), fixadas com solução metanol/ácido acético (1:3 v/v) e armazenadas a -20°C. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa (Merck) 5%. Para cada tratamento foram analisadas 1000 células em microscópio Nikon com objetiva de 100X e anotados o número de células micronucleadas e o número de MN por célula. O experimento foi realizado em triplicata.

A atividade antimutagênica foi estimada pela análise das porcentagens de redução de danos calculadas para cada um dos tratamentos com extrato de *R. mangle*, de acordo com a fórmula proposta por FENECH (2000):

$$\text{Redução (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células com MN em A} - \text{N}^\circ \text{ células com MN em B}}{\text{N}^\circ \text{ células com MN em A} - \text{N}^\circ \text{ células com MN em C}} \times 100$$

A: controle negativo. B: tratamento C: controle positivo

## 2.5 Análises Estatísticas

As médias obtidas para cada tratamento no teste do micronúcleo foram calculadas a partir de três experimentos independentes e submetidas à análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,05$ ) seguida pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad InStat, versão 3.02.

## 2.6 RT PCR Em Tempo Real

A análise de transcritos gênicos foi realizada a partir de culturas de células HTC submetidas ao protocolo de pré tratamento com a concentração de 35,0 µg/mL do extrato aquoso de *R. mangle* por 24 h, seguido de tratamento com Doxorrubicina (0,75 µg/mL) por 24 h. Foram consideradas nas análises células HTC não expostas a nenhum tipo de tratamento (controle negativo) e células expostas à Doxorrubicina (0,75 µg/mL) por 24 h (controle positivo). O RNA total foi extraído usando-se o kit Purelink RNA (Invitrogen, Life Technologies). Todas as amostras de RNA total foram tratadas com 1U de DNase (Invitrogen, Life Technologies).

A síntese de cDNA foi realizada por transcrição reversa a partir de 1 µg de RNA total, utilizando-se o kit Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies), de acordo com o protocolo do fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados nestes experimentos foram construídos com o auxílio do programa Gene Runner versão 3.0 (Tabela 01). Foram analisados transcritos dos genes glutathiona peroxidase (*GPX1*), superóxido dismutase (*SOD1*), glutathiona S-transferase pi (*GSTP1*) e caspase-9 (*CASP9*).

**Tabela 1** – Primers utilizados neste estudo

Gene	Nº GenBank	Primers 5' → 3'	Amplicon
<i>SOD1</i>	NM_017050.1	F: TTTGCTCTCCCAGGTTCCG R: GCCTTGTTGATTGTCCCAT	217pb
<i>GPX1</i>	NM_030826.3	F: AAGTGCAGAGGTGAATGGTG R: CAGGAAATGTCGTTGCGGC	147pb
<i>GSTP1</i>	NM_012577.2	F: ATACTTCATCGTCCACGCAG R: CCACCTCCTCCTTCCAGC	135pb
<i>CASP9</i>	NM_031632.1	F: GCCCTTCCTCGCTTCATCT R: GCTTCACTACTTTCTGCTCC	181pb
<i>β-ACTINA</i>	NM_031144.2	F: CCACACCCGCCACCAAGTT R: CCATACCCACCATCACACC	145pb

As reações de PCR em tempo real foram realizadas a partir de 2 µL de cDNA, 10 µL de Platinum® Sybr green qPCR Supermix-UDG ( Invitrogen, Life Technologies) e 0,5 µL de cada *primer* (10 pMol), em um volume final de 20 µL. Inicialmente foi realizada uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos. Após o término da reação foi

realizada a curva de *melting*, (95°C por 10 segundos, 40°C por um minuto e 50°C até a temperatura de 90°C por 0,5 segundo a cada 0,5°C). As amplificações foram realizadas em termociclador PTC200 com detector de fluorescência Chromo 4 (MJ Research, Biorad). Todas as reações de PCR foram normalizadas utilizando-se o gene constitutivo da  $\beta$ -actina.

Foram realizados dois experimentos independentes e cada reação foi realizada em triplicata. Os dados foram expressos segundo o método de Pfaffl (2001) e calculados com auxílio do Software Rest384 (PFAFFL, 2002), considerando valores de desvio padrão e teste estatístico “Pair wise fixed reallocation”, assumindo significância  $p < 0.05$ .

### **3 Resultados**

#### **3.1 Antimutagenicidade**

Os resultados de antimutagenicidade apresentados na Tabela 2 revelam que o extrato foi capaz de reduzir os danos gerados pelo agente indutor de danos DXR, em todos os protocolos avaliados. A maior proteção foi verificada em condição de pré- tratamento das células com o extrato de *R. mangle*, onde as porcentagens de redução de danos foram maiores do que 90% em todas as concentrações avaliadas. Quando se avaliou o extrato nas duas condições de tratamento simultâneo, foi possível observar que houve uma atuação mais eficaz em protocolo de tratamento simultâneo sem incubação prévia (Tabela 2), que apresentou porcentagens de redução de danos dentro da faixa de 77-80%, valor este intermediário aos protocolos de pré e pós tratamentos. Em condições de protocolo simultâneo com incubação prévia é notável uma redução do efeito protetor quando comparado com o protocolo sem incubação prévia. A porcentagem de redução nestas condições variou entre 50-60%, dados estes similares ao do protocolo de pós tratamento, onde as porcentagens de redução ficaram entre 55 e 60% (Tabela 2).

**Tabela 2** – Frequências de células micronucleadas e porcentagens de redução de danos no DNA de células HTC submetidas ao tratamento com extrato de *R. mangle* L e com Doxorubicina em diferentes protocolos de tratamento.

TRATAMENTOS ( $\mu\text{g/mL}$ )	Frequência de células com MN (1000 células/repetição experimental)					(% redução de danos)
	Experimentos			X $\pm$ DP		
	I	II	III			
<b>Controle</b>	0,0	1,0	2,0	1.0 $\pm$ 1.00	-	
<b>Doxorrubicina</b>					-	
<b>0,75</b>	66	59	61	62.0 $\pm$ 3.61*		
<b>Extrato <i>R. Mangle</i></b>						
<b>17,5</b>	3,0	1,0	0,0	1,33 $\pm$ 1,53	-	
<b>28,0</b>	1,0	1,0	2,0	1,33 $\pm$ 0,58	-	
<b>35,0</b>	1.0	2.0	2.0	1,67 $\pm$ 0,58	-	
<b>Pré-tratamento</b>						
<b>17.5</b>	7.0	7.0	5.0	6.33 $\pm$ 1.15	91.3	
<b>28.0</b>	3.0	4.0	3.0	3.33 $\pm$ 0.58	96.2	
<b>35,0</b>	2,0	3,0	3,0	2,67 $\pm$ 0,58	97,3	
<b>Simultâneo</b>						
<b>17,5</b>	15	15	14	14,7 $\pm$ 0,58	77,7	
<b>28,0</b>	14	13	13	13,3 $\pm$ 0,58	79,8	
<b>35,0</b>	13	13	14	13,3 $\pm$ 0,58	79,8	
<b>Simultâneo incubado</b>						
<b>17,5</b>	30	29	33	30,7 $\pm$ 2,08	51,5	
<b>28,0</b>	30	27	28	28,3 $\pm$ 1,53	55,2	
<b>35,0</b>	25	29	23	25,7 $\pm$ 3,06	59,7	
<b>Pós tratamento</b>						
<b>17,5</b>	30	29	28	29,0 $\pm$ 1,00	54,1	
<b>28,0</b>	26	25	26	25,7 $\pm$ 0,58	59,7	
<b>35,0</b>	28	25	24	25,7 $\pm$ 2,08	59,7	

X  $\pm$  DP ; Média  $\pm$  Desvio padrão

\* Valor significativamente diferente dos demais ao nível de 5% pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

### 3.2 Análise dos Transcritos Gênicos GPX1, SOD1, GSTP1 e CASP9 em Células HTC

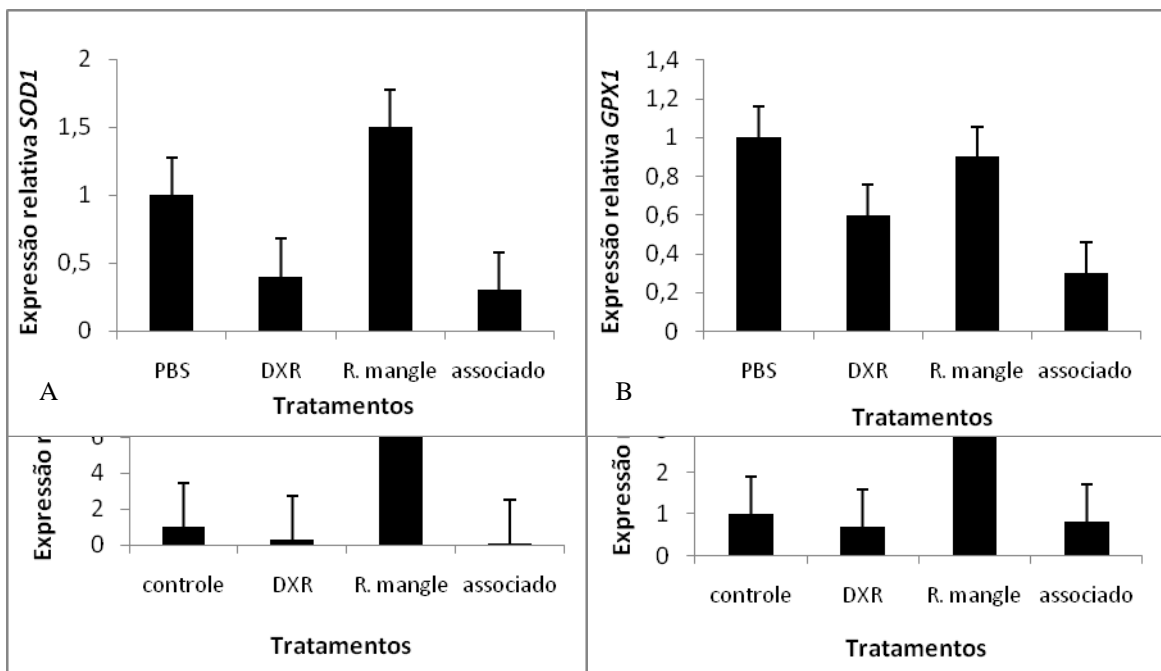
Os dados da análise transcricional dos genes *GPX1*, *SOD1*, *GSTP1* e *CASP9* em células HTC expostas aos diferentes tratamentos indicaram algumas

alterações significativas em relação às células do grupo controle, como demonstrado na Figura 1.

Nas células expostas somente ao extrato de *R. mangle* foi observada a indução dos transcritos gênicos SOD1, CASP9 e GSTP1, (1,5; 10,1 e 4,4 vezes, respectivamente) (Figura 1 A, C e D), enquanto nas células expostas somente à DXR, houve repressão significativa dos transcritos gênicos SOD1, GPX1 e CASP9 (0,4; 0,6 e 0,3 vezes, respectivamente) (Figura 1 A, B e C).

Em células HTC expostas previamente ao extrato de *R. mangle* e em seguida à DXR, também foi observado um decréscimo dos transcritos gênicos SOD1, GPX1 e CASP9 (0,3; 0,3 e 0,1, respectivamente) (Figura 1 A, B e C).

O transcrito gênico GSTP1 não sofreu alteração nas células tratadas somente com DXR e no tratamento associado extrato+DXR. Também não foi detectada alteração na atividade do transcrito gênico GPX1 nas células submetidas somente ao extrato de *R. mangle*.



**Figura 1** - Expressão relativa dos transcritos gênicos GPX1, SOD1, GSTP1 e CASP9 em células HTC submetidas a tratamento com PBS (Controle); Doxorubicina (DXR) 0,75 µg/mL; Extrato de *R. mangle* 35,0 µg/mL e tratamento com extrato de *R. mangle* 35,0 µg/mL seguido de tratamento com Doxorubicina 0,75 µg/mL. Todos os dados foram normalizados com o gene  $\beta$ -actina.

## 4 Discussão

Um grande número de evidências científicas associa o processo de estresse oxidativo com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, envelhecimento e câncer (GUTTERIDGE, 1993). Como medida preventiva e terapêutica, numerosos compostos naturais têm sido utilizados como agentes quimiopreventivos para reduzir o estresse oxidativo, sendo os derivados de plantas antioxidantes como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e polifenóis, os mais recomendados (MIDDLETON; KANDASWANI, 1992; SEM; PACKER, 1996; MATES SANCHEZ-JIMENEZ, 2000;).

Neste contexto, destaca-se a *Rhizophora mangle*, uma espécie nativa de manguezal, que apresenta grandes quantidades de compostos polifenólicos do grupo dos taninos (SANCHEZ *et al.*, 2007; MALINI *et al.*, 2010). A atividade antioxidante do extrato aquoso desta espécie já foi comprovada por estudos realizados por BERENQUER *et al.* (2006) e SANCHÉZ *et al.* (2006), que demonstraram em modelos *in vitro* e *in vivo*, a capacidade deste extrato quelar íons de ferro e aumentar a atividade das enzimas de defesa antioxidante (GPX e SOD). Este caráter antioxidante torna o extrato de *R. mangle* um forte candidato a agente quimioprotetor. Entretanto, estudos sobre antimutagenicidade desta planta são escassos. A literatura apresenta apenas o artigo publicado por nosso grupo de pesquisa (MALINI *et al.*, 2010), onde foi verificada a atividade antimutagênica de *R. mangle* em células CHO-K1 em sistema teste *Allium cepa*.

No presente trabalho avaliamos a atividade antimutagênica do extrato de *R. mangle* por meio do ensaio do micronúcleo, cujos resultados revelaram efeito quimioprotetor em todos os protocolos avaliados em células HTC, sugerindo tanto mecanismo de ação desmutagênica quanto bioantimutagênica. Entretanto, o efeito desmutagênico parece ser o mais relevante, já que houve um aumento expressivo na porcentagem de redução de danos quando foi utilizado o protocolo de pré tratamento em relação aos demais protocolos avaliados. Estes resultados corroboram os achados anteriormente publicados (MALINI *et al.*, 2010), em que células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) expostas ao extrato de *R. mangle* (17,5  $\mu\text{g/mL}$ ) associado aos agentes indutores de danos Doxorubicina e Metil metanosulfonato ( $4,0 \times 10^{-4}$  M) tiveram redução dos danos em seus DNAs, por meio do processo de desmutagênese.

No presente estudo foi verificada uma porcentagem elevada de redução de danos no DNA em condições de pré tratamento e tratamento simultâneo, observando-se uma menor porcentagem de redução de danos para os protocolos de tratamento simultâneo com incubação e pós-tratamento. A comparação dos resultados de tratamento simultâneo com e sem incubação prévia revelou que a interação extrato-agente indutor diminui a proteção em aproximadamente 20%, já que a porcentagem de redução de danos em condições de tratamento simultâneo foi de 70-80% e diminui para 50-60% quando em condições de pré incubação.

Os dados de quimioproteção em condições de pós tratamento foram semelhantes aos encontrados em tratamento simultâneo com incubação prévia, indicando que o mecanismo principal de ação deste extrato nas células não ocorre preferencialmente por ativação do sistema de reparo do DNA. A hipótese mais viável para explicar o mecanismo de ação desmutagênica do extrato frente à DXR seria por indução de enzimas metabolizadoras ou de enzimas de defesa antioxidante. Para melhor compreender este mecanismo do extrato de *R. mangle*, foram realizadas análises de expressão de genes relacionados com processos antioxidantes (*GPX1* e *SOD1*), de biotransformação de drogas (*GSTP1*) e de apoptose (*CASP9*).

Além de sua atividade antioxidante, pesquisas recentes demonstram que os compostos polifenólicos apresentam propriedades adicionais de interferência em vias de sinalização, regulação celular e modulação do sistema enzimático endógeno, a fim de aumentar a defesa antioxidante e potencializar este efeito (MIDDLETON *et al.*, 2000; SPENCER *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2004). Nossos resultados corroboram estes achados, pois encontramos uma modulação significativa exercida pelo extrato de *R. mangle* no gene *SOD1*, em células HTC expostas somente ao extrato de *R. mangle*. Isto indica que este extrato, rico em composto polifenólicos, atua potencializando as defesas antioxidantes das células mesmo na ausência de qualquer substância indutora de ERO. No entanto, o extrato não foi capaz de alterar o transcrito do gene *GPX*, provavelmente porque este gene, apesar de também envolvido na defesa antioxidante, atue por uma via diferente daquela utilizada pelo gene *SOD1* e, provavelmente, não sofre ação dos polifenóis. Quando as células HTC foram expostas à DXR, um agente promotor de vários tipos de lesões no DNA, foi observado um decréscimo de transcritos relacionados ao processo de estresse oxidativo.

Os altos níveis de transcrito do gene *CASP9* encontrados nas células HTC tratadas com o extrato indicam que está sendo ativado o processo de apoptose nestas células tumorais. No entanto, a presença do agente indutor de danos DXR, tanto em tratamento único quanto em tratamento associado, reprimiu a expressão do gene *CASP9*. Esta repressão de gene pró-apoptótico pela DXR já foi observada em estudos similares que avaliaram o potencial quimioprotetor do polifenol curcumina em células de câncer hepático (NORTARBARTOLO *et al.*, 2005). Neste estudo os autores usaram os agentes cisplatina e DXR e verificaram que ambos promoveram um decréscimo na expressão do gene pró-apoptótico *Bcl-XS*, sendo a repressão da expressão significativa somente com a cisplatina. De acordo com SOMASUNDARAM *et al.* (2002), a inibição da apoptose induzida pela DXR ocorre devido ao bloqueio da formação de ERO e ativação da enzima Jun N-terminal Kinase (JNK), ambos importantes sinais para liberação do citocromo c da mitocôndria para as células. Podemos inferir que no presente estudo o tratamento das células com DXR inibiu fortemente a expressão de *CASP-9*, inclusive no tratamento associado, onde a indução do transcrito anteriormente observada com o extrato sozinho foi totalmente revertida.

A indução de apoptose já havia sido observada em estudos de apoptose por coloração diferenciada com brometo de etídeo e laranja de acridina com esta mesma concentração do extrato de *R. mangle* (dados não publicados). Desta forma, a análise molecular foi concordante com os ensaios citogenéticos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa. O gene da glutationa S-transferase P1 (*GSTP1*) desempenha um papel importante na desintoxicação celular, por catalisar a conjugação de compostos eletrofílicos, como drogas, toxinas e agentes cancerígenos (MORROW *et al.*, 1990; SCHIPPER, 1997). A expressão relativa do transcrito *GSTP1* mostrou-se aumentada nas células tratadas com o extrato de *R. mangle*, o que pode ser atribuído ao processo de metabolização do próprio extrato. Esta indução, segundo SINGH *et al.* (1998), pode ter como consequência o aumento da capacidade de detoxificação das células. Estes autores afirmaram isto após submeterem ratas a uma dieta com curcumina e também observarem indução da expressão do gene *GSTP1*.

De maneira geral os resultados de quimioproteção e expressão gênica encontrados no presente estudo foram um passo inicial para a elucidação do mecanismo de ação desmutagênica do extrato de *R. mangle*. Estudos envolvendo

novos genes alvos, aliados a diferentes agentes indutores e tempos de exposição serão necessários para se ter uma visão mais abrangente do processo. A atividade bioantimutagênica observada também deve ser investigada, já que seus resultados de proteção foram maiores que 50%, o que é bastante significativo em estudos de quimioprevenção. A análise conjunta dos dados obtidos neste estudo em células metabolizadoras (HTC) e os obtidos em estudos anteriores com células sem sistema de metabolização (CHO-K1) (MALINI *et al.*, 2010) demonstra que o efeito protetor deste extrato se mantém antes e após o processo de biotransformação, o que demonstra o grande potencial quimioprotetor deste extrato mesmo passando por modificações em sua estrutura original.

### **Agradecimentos**

Ao Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do município de Vitória (FACITEC) e ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro. À Capes pela bolsa de mestrado concedida a Malini, M.C. e ao CNPq pela bolsa PQ concedida a Cólus, I.M.S. À Dra. Roberta Losi-Guembrovski pelo auxílio no delineamento dos experimento de RT-PCR.

### **Referências**

AGUERO, F.; BULNES, C.; DURAND, R. et al. Ensayo de irritabilidad vaginal a um producto natural, obtenido a partir de *Rhizophora mangle* L. destinado al tratamiento de infecciones uterinas. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, v. 4, 2005.

ARMSTRONG, R. N. Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, p. 2–18, 1997.

BERENQUER, B.; SÁNCHEZ, A. Q.; LÓPEZ-BARREIRO, M. et al. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID – induced gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 194-200, 2006.

BERENQUER, B.; SÁNCHEZ, A. Q.; LÓPEZ-BARREIRO, M. et al. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID – induced gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 194-200, 2006.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, p.157– 177, 2001.

BRAUNWALD, E.; SHULMAN, L. N.; EROENTHAL, D. S. **Distúrbios hematológicos, oncológicos e cardiopatias**. In: BRAUNWALD, E. Tratado de medicina cardiovascular. São Paulo: Roca, 1999. p.1930–1934.

CHAPMAN, V. J. Mangrove phytosociology. **Tropical Ecology**, v. 11, p. 1-10, 1970.

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

FENECH, M.; MORLEY, A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147. p. 29-36, 1985.

FISCHER, P. M.; LANE, D. P. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anticancer therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1213– 1245, 2000.

FRIEDBERG, E. C. D. N. A. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, p. 436–440, 2003.

GAMET-PAYRASTRE, L.; AGULLO, G.; MANENTI, S. et al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Pharmacology Biochemistry**, v. 53, p. 1649– 1657, 1997.

GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in diseases processes: a compilation of cause and consequence. **Free Radic Research Communications**, v. 19, p. 141-158, 1993.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutatat Research**, v. 275, p. 257-266, 1992.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, p. 1–6, 2005.

JAYAPRAKASHA, P. S.; NEGI, B. S.; JENA, L. et al. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts G K **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 330–336, 2007.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. Environmental desmutagens and antimutagens. In: KLEKOWSKI, E. J. (ed.), **Environmental mutagenesis and plant biology**. New York: Praeger, 1982. pp. 137-151.

LAUGHTON, M. J.; EVANS, P. J.; MORONEY, M. A. et al. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. 1673–1681, 1991.

MALIK, M.; MAGNUSON, B. A. Rapid method for identification of chemopreventive compounds using multiplex RT-PCR for cyclooxygenase mRNA expression. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, p. 277–282, 2004.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S. et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (*Rhizophoraceae*) using *in vivo* and *in vitro* test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1. p. 176-181, 2010.

MASELLA, R. T.; DI BENEDETTO, R.; VARI, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577–586, 2005

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, p. 157-170, 2000.

MIDDLETON, E. J. R.; KANDASWANI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, p. 1167–1179, 1992.

MORROW, C. S.; GOLDSMITH, M. E.; COWAN, K. H. Regulation of human glutathione S-transferase pi gene transcription: influence of 50-flanking sequences and trans-activating factors which recognize AP-1-binding sites. **Gene**, v. 88, n. 2, p. 215–25, 1990.

MUELLER, S. O.; SIMON, S.; CHAE, K. et al. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. **Society of Toxicology**, v. 80, p. 14–25, 2004.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2004-2007, 2001.

SÁNCHEZ, J.; MELCHOR, G.; MARTÍNEZ, G. et al. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 141-143, 2006.

SÁNCHEZ, J.; MELCHOR, G.; MARTÍNEZ, G. et al. Protective effect of *Rhizophora mangle* bark on lipid peroxidation and erythrocyte hemolysis. **Pharmacognosy Magazine**, v. 1, p. 101-105, 2005.

SANCHEZ, L. M.; MELCHOR, G.; ALVAREZ, S. et al. Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. **Revista de Salud Animal**, v. 20, n. 1, p. 69-72, 1998.

SAU, A.; PELLIZZARI TREGNO, F.; VALENTINO, F. et al. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 116–122, 2010.

SCHEWE, T.; SADIK, C.; KLOTZ, L. O. et al. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 382, p. 1687–1696, 2001.

SCHIPPER, L. Glutathione S-transferases and cancer. **International Journal of Oncology**, v. 10, p. 1261-1264, 1997.

SEN, C. K.; PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **FASEB J.**, v. 10, p. 709– 720, 1996.

SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C.; WILLIAMS, R. J. Modulation of pro-survival Akt/PKB and ERK1/2 signalling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 34783– 34793, 2003.

SPENCER, J. P. E.; SCHROETER, H.; KUHNLE, G. et al. Epicatechin and its in vivo metabolite 3VO-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3-activation. **Biochemical Journal**, v. 35, p. 493– 500, 2001.

SURH, Y. J. Anti-tumour promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: short review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1091–1097, 2002.

TAKARA, K.; KUNIYOSHI, A.; WADA, K. et al. Antioxidative flavan-3-ol glycosides from stems of *Rhizophora stylosa*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 8, p. 2191-2194, 2008.

TALLARICO, D.; RIZZO, V.; DI MAIO, F. et al. Myocardial cytoprotection by trimetazidine against anthracycline-induced cardiotoxicity in anticancer chemotherapy. **Angiology**, v. 54, n. 2, p. 219-27, 2003.

TOKUDOME, T.; MIZUSHIGE, K.; NOMA, T. et al. Prevention of doxorubicin (adriamycin)-induced cardiomyopathy by simultaneous administration of angiotensin-

converting enzyme inhibitor assessed by acoustic densitometry. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 361-368, 2000.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F. et al. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v. 238, p. 57-85, 1990.

WAY, T. D.; KAO, M. C.; LIN, J. K. Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 145–52, 2005.

WILLIAM, S. R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radic Biology & Medicine**, v. 36, p. 838– 49, 2004.

YI-SHING, M. A.; SHI-BEI, W. U.; WAN-YU, L. E. E. et al. Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p. 1021–1029, 2009.