

EFEITOS GENOTÓXICOS DO EXTRATO AQUOSO DE AVENCA EM LINFÓCITOS HUMANOS¹

GENOTOXICAL EFFECTS OF AQUEOUS EXTRACT FROM MAIDENHAIR IN HUMAN LYMPHOCYTES

Fernando Bandeira Sulczewski², Alencar Kolinski Machado³, Ivana Beatrice Mânica da Cruz³, Aline Grohe Schirmer Pigatto⁴, Michele Rorato Sagrillo⁵ e Luciana Maria Fontanari Krause⁶

RESUMO

O estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo de espécies reativas (ERs) na célula. Estas podem induzir lesões em suas estruturas, incluindo o DNA, promovendo morte ou proliferação celular devido a sua citotoxicidade e genotoxicidade. Extratos de plantas são ricos em antioxidantes, que podem prevenir e diminuir os efeitos do estresse oxidativo. Assim, neste trabalho, objetivou-se analisar a atividade genotóxica do extrato aquoso de *Adiantum lorentzii* Hieron (Pteridaceae) em linfócitos humanos. Essa planta é conhecida popularmente como avenca e é utilizada na medicina popular na forma de chá. O material botânico foi coletado no município de Derrubadas, RS, Brasil, seco, triturado e o extrato aquoso foi preparado. Os testes realizados foram de instabilidade cromossômica e ensaio cometa. Os resultados apontam que as concentrações de 300 e 500 µg/mL provocaram alterações cromossômicas e metanucleares nas células analisadas com diminuição do índice mitótico.

Palavras-chave: estresse oxidativo, fitoterapia, danos cromossômicos.

ABSTRACT

*Oxidative stress is characterized by the accumulation of reactive oxygen species (ERs) in the cell. They can induce lesions in their structures, including DNA, promoting cell proliferation or cell death due to their cytotoxicity and genotoxicity. Plant extracts are rich in antioxidants that can prevent and reduce the effects of oxidative stress. This study aimed to analyze the genotoxic activity of aqueous extract of *Adiantum lorentzii* Hieron (Pteridaceae) in human lymphocytes. This plant is popularly known as maidenhair and is used in popular medicine in form of tea. The botanical material was collected in the city of Derrubadas, RS, Brazil. The leaves were dried, triturated and the aqueous extract was prepared. The tests performed were chromosomal instability and the comet test. The results indicate that concentrations of 300 e 500 µg/mL induced chromosomal and metanuclear alterations with the lowering of the mitotic index.*

Keywords: oxidative stress, phytotherapy, chromosomal damage.

¹ Trabalho de Iniciação Científica.

² Acadêmico do Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano.

³ Colaboradores. Alunos do Programa de Pós-graduação em Farmacologia - UFSM.

⁴ Colaboradora - Centro Universitário Franciscano.

⁵ Coorientadora - Centro Universitário Franciscano.

⁶ Orientadora - Centro Universitário Franciscano.

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo está relacionado à citotoxicidade. Ele é caracterizado pelo desequilíbrio entre as espécies reativas (ERs) e os agentes antioxidantes. As ERs podem causar danos nos componentes celulares, como material genético, membrana celular e proteínas celulares. Uma das suas principais consequências são as quebras na estrutura do DNA, resultando em instabilidade cromossômica, alterações genéticas e problemas relacionados à divisão celular (KLAUNING; KAMENDULI; HOCEVAR, 2010).

Quando as células são expostas a agentes redutores surgem danos em sua estrutura cromossômica como, por exemplo, quebras de cromátides, quebras cromossômicas, cromossomos em anéis, inclusive cromossomo tri-radial e tetra-radial e alterações metanucleares (ASAITHAMBY; HU; CHEN, 2010). Esses danos são acumulados ao longo das divisões celulares. No processo de divisão celular, quando o sistema de reparo, com os *checkpoints* celulares, não consegue reparar alguma lesão, esta se perpetua no material genético dessa linhagem que tende a sofrer mais danos oxidativos. Assim, as lesões no DNA, a senescência celular e o limite de “*hayflick*” estão diretamente relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer por acúmulo de lesões no genoma (TUDEK et al., 2010).

Além das quebras nas fitas de DNA, o mecanismo mutagênico 8-hidroxi guanina (8-oxo-dG) é bastante estudado. Em condições de estresse oxidativo, a guanina reage com o radical hidroxila, de maneira que resulta na via final a 8-oxo-dG, que é responsável pela substituição de pareamentos G-C por A-T (CHENG et al., 1992). Essas mutações pontuais podem se acumular no genoma e alterar a proteína resultante da expressão de um gene, assim esse produto mutante pode resultar em um material amorfo, ou seja, sem função ou, ainda, ganhar uma nova função (LEWIN, 2009).

Em pequenas concentrações, as ERs parecem estimular a proliferação celular pela ativação de proto-oncogenes (carcinogênese), e em quantidades elevadas e exposição aguda podem provocar mitose, apoptose, necrose e autofagia (KLAUNING; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010). As diferentes respostas celulares, frente às ERs, ocorrem devido a sua influência no potencial redox da célula. Isso ativa diferentes cascatas de sinalização celular, que gera diferentes consequências e, inclusive, provoca alterações metanucleares (OYAGBEMI; AZEEZ; SABA, 2009).

Nesse contexto, a avaliação da atividade genotóxica de extratos de plantas é de suma importância, pois pode contribuir para a validação e posterior uso dessas espécies como possível agente farmacogenômico ou nutrigenômico. Os estudos científicos envolvendo plantas medicinais precisam ser incentivados, pois seu uso popular é constante, porém, nem sempre realizado de forma segura devido à falta de certificação das propriedades farmacológicas dessas plantas, bem como o não conhecimento de seus efeitos colaterais ou toxicológicos (VARANDA, 2006). Um dos principais mecanismos de toxicidade associado a extratos de plantas é a geração de radicais livres (KAJIMOTO

et al., 2002). Estes induzem lesões celulares que podem ser detectadas pela análise de marcadores de genotoxicidade, necrose e apoptose.

Assim, este estudo teve por objetivo avaliar a genotoxicidade do extrato aquoso de *Adiantum lorentzii* Hieron (Pteridaceae). Esta planta é encontrada em matas e encostas, em locais sombreados ou expostos ao sol. Ela é conhecida popularmente como avenca, sendo distribuída na América do Sul do Peru à Argentina, no Brasil do cerrado até o Rio Grande do Sul (RS) (WINTER; SYLVESTRE; PRADO, 2011). No Rio Grande do Sul, essa planta está presente em todas as regiões fisiográficas (NERVO; WINDISCH; LORSCHHEITTER, 2010). Popularmente, a espécie é utilizada para o tratamento de resfriados, febre, tosse, doenças brônquicas, estimulante, purgante, tônico estimulante capilar, bem como para doenças de pele, tumores gástricos, de baço, fígado e outras vísceras (SINGH et al., 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL BOTÂNICO E EXTRATO

A planta foi coletada no município de Derrubadas, no estado do Rio Grande do Sul, no mês de junho de 2012. Um espécime coletado foi identificado pelo Professor Dr. Paulo Günter Windisch da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e depositado no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM, catalogado sob o número SMDB 13920. Após o processo de secagem em estufa com circulação de ar a 40°C, a planta foi triturada e o extrato aquoso foi preparado por infusão conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (1988).

CULTURA CELULAR

As culturas celulares foram realizadas com sangue periférico total em garrafas com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibiótico e fitohemaglutinina. Para determinar as concentrações a serem testadas, foi realizado um teste de atividade *scavenger* de radicais de DPPH (2,2 difenil-1-picril hidrazil), as concentrações que apresentaram inibição do radical livre foram utilizadas nos demais testes, com a adição de uma concentração inferior (resultado não demonstrado). Assim, as células foram tratadas com o extrato aquoso de *A. lorentzii* nas concentrações de 75, 100, 300 e 500µg/mL. Como controle negativo, foram utilizadas somente células com meio de cultura e como controle positivo foi adicionado somente peróxido de hidrogênio. As células foram mantidas em cultura por 72 horas, em estufa a 37°C, com saturação de 5% de CO₂.

INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

Para o teste de instabilidade cromossômica, após o período de cultura, foi adicionado colchicina por uma hora, centrifugado e adicionado uma solução hipotônica de cloreto de potássio. Após, foram realizados banhos de fixador *Carnoy* (metanol e ácido acético, 3:1) e as lâminas fixadas. Posteriormente, foram coradas com *Giemsa*. As análises de instabilidade cromossômica foram realizadas em microscópio óptico em objetiva de 100x, em que foram analisadas 100 metáfases de cada tratamento, quando possível. O índice mitótico foi determinado a partir do número de metáfases encontradas. As alterações metanucleares foram divididas em Cariorréxe, Pcnose e “*Broken eggs*”, foram analisadas 1000 núcleos interfásicos por tratamento.

ENSAIO COMETA

O ensaio Cometa foi realizado de acordo com Nadin, Vargas-Roig e Ciocca (2001), neste, as células sofreram processos de lise de membranas para expor seu material genético e as amostras foram submetidas ao processo de eletroforese em meio alcalino para arraste do material, em que as fitas do DNA se desnaturam e, em caso de quebra, migram para a extremidade positiva. Após processos de neutralização e fixação, as lâminas foram coradas com uma solução de nitrato de prata. Assim, foi possível analisar os danos no DNA de cada célula, baseando-se na formação de uma “cauda” que lembra um cometa. Os cometas são quantificados em danos 0, 1, 2, 3, 4 e apoptose. O teste foi realizado em duplicata com a análise de 50 células por lâmina (SILVA, 2007). O índice de danos foi calculado pelo somatório das duplicatas e dividido pelo total de células analisadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

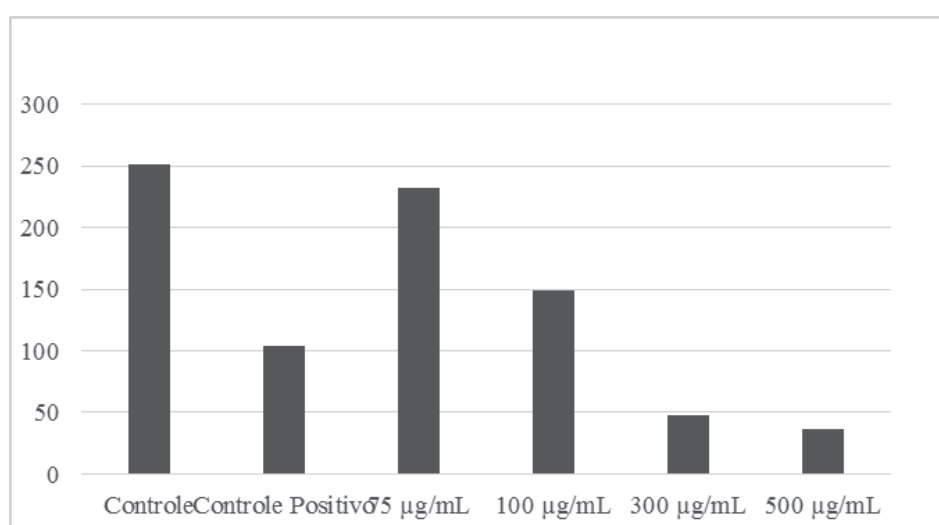
Na tabela 1, mostram-se os resultados obtidos a partir da análise da instabilidade cromossômica, ressaltando as metáfases analisadas em cada tratamento e, destas, as que apresentaram alguma alteração cromossômica.

Tabela 1 - Número de metáfases alteradas, por tratamento, pelo método de instabilidade cromossômica.

Tratamento	Metáfases analisadas	Metáfases alteradas
Controle	100	7
Controle Positivo	100	87
75 µg/mL	100	7
100 µg/mL	100	8
300 µg/mL	48	8
500 µg/mL	36	12

Os resultados do teste de instabilidade cromossômica apontam as concentrações em que o extrato aquoso de *A. lonrentzii* provoca alteração na estrutura dos cromossomos de linfócitos humanos em cultura. No controle positivo, com peróxido de hidrogênio, percebe-se um grande número de metáfases com algum tipo de quebra cromossômica (n=87). As concentrações de 75 e 100µg/mL não provocaram um aumento considerável de alterações comparadas com o controle (n=7, n=8, respectivamente). Nas concentrações de 300 e 500µg/mL, não foi possível analisar 100 metáfases, devido ao índice mitótico que decresce com aumento da concentração (Figura 1). Contudo, estas apresentaram quebras em oito metáfases na concentração de 300µg/mL e 12 na concentração de 500µg/mL.

Figura 1 - Índice Mitótico de linfócitos humanos tratados com extrato aquoso de *A. lonrentzii* pela técnica de instabilidade cromossômica, expressos pelo número de metáfases encontradas em cada tratamento.



As alterações metanucleares encontradas nos núcleos interfásicos das células mononucleares de sangue periférico tratados na técnica de instabilidade cromossômica revelam a toxicidade do extrato aquoso nessas células. As alterações cariorréxes são características de necrose ou apoptose celular, a cariopinicose de necrose e os “Broken Eggs” podem ser causados por quebras cromossômicas ou amplificação do material genético da célula (MALUF et al., 2011). Com o aumento da concentração do extrato, percebe-se um aumento dessas alterações, principalmente as cariorréxes. Todas as concentrações do extrato apresentaram menos alterações metanucleares em relação ao controle positivo e mais danos em relação ao controle, como pode ser observado na tabela 2.

Essas alterações morfológicas nos núcleos celulares podem ser provocadas pela toxicidade do extrato diretamente ao DNA ou por mecanismos celulares endógenos em resposta a sua presença no citoplasma celular. O extrato pode alterar o estado de equilíbrio redox da célula e influenciar vias de sinalização. As *Mitogen-activated protein* (MAP) ou *Mitogen-activated protein Kinase* (MAPK) atuam como fatores de transcrição influenciados pelas *Extracellular signal proteins kinases* (ERKs), relacionando-se com a estimulação da divisão celular. Elas, também, interagem com as *Stress-activated protein kinase* (SAPKs) ou *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs) e p38 podendo resultar em

fragmentação do DNA por apoptose ou divisão celular. Outra via de resposta a danos oxidativos é comandada pelo fator de transcrição p53, responsável por estimular o sistema de reparo celular, senescência, apoptose (ativação da família bcl-2) e parada do ciclo celular. Frente a lesões celulares a, p53 é ativada podendo provocar apoptose e, consecutivamente, a fragmentação do DNA (WARIS; AHSAN, 2006).

Tabela 2 - Alterações metanucleares em linfócitos humanos tratados com extrato aquoso de *A. lonrentzii* pela técnica de instabilidade cromossômica.

Tratamento	Núcleos Túrgidos	Cariopícnose	Broken egg	Cariorrêxe	Núcleos Analisados
Controle	909	29	27	35	1000
Controle Positivo	370	235	84	311	1000
75 µg/mL	821	69	32	78	1000
100 µg/mL	689	101	63	147	1000
300 µg/mL	473	97	45	385	1000
500µg/mL	399	135	66	400	1000

No ensaio cometa, pôde-se verificar que o extrato aquoso de *A. lonrentzii* provocou danos de quebra de cadeia na estrutura da molécula do DNA das células em cultura. Todas as concentrações do extrato de *A. lonrentzii* provocaram um aumento do índice de danos em relação ao controle, a concentração de 500µg/mL apresentou o maior índice (0,88 por célula analisada). O índice de dano por célula analisada ficou abaixo do controle positivo em todas as concentrações testadas (Tabela 3).

Os danos de quebra de cadeia, analisados através do ensaio cometa em meio alcalino, podem ser tanto de cadeia dupla como de cadeia simples. O pH alcalino do meio quebra as pontes de hidrogênio entre as cadeias polinucleotídicas de DNA, possibilitando a análise de danos de cadeia simples. Estes danos podem evoluir para uma região de quebra dupla nas seguintes situações: quando há duas quebras simples muito próximas; quando as topoisomerases se clivam próximas a um ponto de quebra; quando uma lesão oxidativa interfere nos processos de replicação e transcrição, tanto topo dependente quanto topo independente e, raramente, o sistema de reparo de excisão de nucleotídeos (SEDELNIKOVA et al., 2010).

Tabela 3 - Índice de dano em linfócitos tratados com extrato aquoso de *A. lonrentzii*.

O índice de dano foi calculado pelo somatório das duplicatas e dividido pelo total de células analisadas.

Tratamento	Duplicata A	Duplicata B	Índice de células com dano	Média de Apoptose
Controle	8	13	0,21	2,5
Controle Positivo	54	47	1,01	6,5
75 µg/mL	26	31	0,57	6
100 µg/mL	28	28	0,56	2
300 µg/mL	23	27	0,50	0
500µg/mL	49	39	0,88	7

O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa que no interior das células se degrada em duas hidroxilas (OH⁻). Essas possuem alta afinidade com o DNA e provocam alterações oxidativas em sua estrutura, resultando em quebras de cadeia e oxidação de bases nitrogenadas (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010). As alterações encontradas no controle positivo, quebras cromossômicas, inclusive cromossomos em anel, bem como um elevado índice de quebras das cadeias de DNA, em nível gênico, mostram seu efeito genotóxico associado ao caráter oxidativo. O extrato de *A. lorentzii* provocou alterações similares nas metáfases, não sendo verificado cromossomo em anel. A alteração metanuclear mais frequente depois dos tratamentos foi a cariorréxe, indicando uma fragmentação do material genético dessas células, corroborando o aumento do índice de danos pelo ensaio cometa, observado nas maiores concentrações e no controle positivo. Dessa maneira, sugerindo que sua genotoxicidade pode estar relacionada à geração de ERs.

Os resultados de genotoxicidade apontam que, em linfócitos humanos, o extrato aquoso de *A. lorentzii* pode provocar alterações na estrutura normal do DNA, causando quebras de cadeia e alterações cromossômicas e metanucleares nas concentrações mais elevadas. Entretanto, de acordo com Singh et al. (2007), o gênero *Adiantum* é utilizado na medicina popular na forma de chá. Dessa forma, o consumo deste deve respeitar sua faixa de segurança para evitar a geração de lesões oxidativas e o acúmulo desses danos no genoma, ao longo das exposições a agentes pró-oxidantes.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que com o aumento da concentração do extrato aquoso há um aumento da toxicidade e, nas concentrações mais elevadas (300 e 500µg/mL), há aumento das alterações genéticas. Assim, essas concentrações apresentaram efeitos genotóxicos pelos danos provocados no DNA tanto em nível cromossômico quanto gênico (representado pelo ensaio cometa).

REFERÊNCIAS

ASAITHAMBY, A.; HU, B.; CHEN, D. J. Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells. **PNAS**, v. 108, n. 20, p. 8293-8298, 2011.

CHENG, K. C. et al. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. **J Biol Chem.**, v. 267, p. 166-172, 1992.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

KAJIMOTO, S.; TAKANASHI, N.; KAJIMOTO, T.; et al. Sophoranone, extracted from a traditional chinese medicine shan dou gen, induces apoptosis in human leukemia U937 cells via formation of reactive oxygen species and opening of mitochondrial permeability transition pores. **Int. J. Cancer**, v. 99, p. 879-890, 2002.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. **Toxicol Pathol.**, v. 38, p. 96-109, 2010.

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

MALUF, S. W. et al. **Citogenética Humana**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183-1186, 2001.

NERVO, M. H.; WINDISCH, P. G.; LORSCHBITTER, M. L. Representatividade Da Base Amostral Da Pteridoflora Do Estado Do Rio Grande Do Sul (Brasil) E Novos Registros De Distribuição. **Pesquisa Botânica**, v. 61, p. 245-258, 2010.

OYAGBEMI, A. A.; AZEEZ, O. I.; SABA, A. B. Interactions between Reactive Oxygen Species and Cancer: the Roles of Natural Dietary Antioxidants and their Molecular mechanisms of Action. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 10, p. 535-544, 2009.

SEDELNIKOVA, O. A. et al. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. **Mutat. Res.**, v. 704, n. 1-3, p. 152-159, 2010.

SILVA, J. da. O uso do ensaio cometa para o ensino de Genética Toxicológica. **Genética na escola**, v. 2, n. 2, p. 30-33, 2007.

SINGH, M. et al. Antimicrobial activity of some important Adiantum species used traditionally in indigenous systems of medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 2008, p. 327-329, 2007.

TUDEK, B.; WINCZURA, A.; JANIK, J.; et al. Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. **Am J Transl Res.**, v. 2, n. 3, p. 254-284, 2010.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

WARIS, G.; AHSAN, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. **Journal of Carcinogenesis**, v. 5, n. 14, p. 1-8, 2006.

WINTER, S. L. S., SYLVESTRE, L. S.; PRADO, J. O gênero Adiantum (Pteridaceae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 663-681, 2011.