

**Universidade do Algarve**

**“Estudo da Atividade Protetora de Extratos Vegetais  
Contra Stresse Genotóxico”**

**Renata Filipa de Sousa Moreira**

**Dissertação de Mestrado**

**Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana**

**Trabalho efetuado sob a orientação:**

**Professor Doutor Rui Oliveira**

**Professora Doutora Leonor Faleiro**

**2015**

## Declaração de Autoria de Trabalho

“Estudo da atividade protetora de extratos vegetais contra stresse genotóxico”

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos e consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Assinatura: Renata Filipa Sousa Moreira

Universidade do Algarve, 30 de Setembro, 2015

© Renata Moreira

A universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventada, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

Dedico este espaço a todos que contribuíram para a realização desta dissertação. Como não é possível mencionar toda a gente, deixo já um grande OBRIGADO sincero, para todos. No entanto, há alguns que não posso deixar de demonstrar a devida consideração e gratidão.

Ao meu orientador, Rui Oliveira, da Universidade do Minho, Braga, por me ter dado a oportunidade de trabalhar e aprender com ele. Agradeço o seu entusiasmo, reconhecimento, disponibilidade e amizade.

Aos meus professores da Universidade do Algarve, a minha orientadora Leonor Faleiro e a minha professora Filomena Fonseca, agradeço toda a disponibilidade, paciência, ajuda e amizade.

Aos colegas de trabalho, da Universidade do Minho, Braga, por me terem recebido bem, pela ajuda que me deram, na realização do meu trabalho, pela amizade e pelos momentos divertidos que nos faziam descontrair um bocadinho.

Aos funcionários do departamento de Biologia, da Universidade do Minho, Braga, por toda a assistência e disponibilidade, na realização deste trabalho. Agradeço especialmente ao Sr. Luís, por fazer os possíveis e impossíveis.

Aos meus amigos, da Universidade do Algarve, que sempre me apoiaram, ajudaram e nunca me deixaram sem teto e diversão, quando tinha de ir a Faro.

Aos investigadores Stefani Fancesconi e Benoit Ancangioli, do Institut Pasteur, Paris, por terem fornecido as estipes de *Sch. pombe*, utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Tulay Celik, do departamento de Biologia, da Universidade de Adnan Menderes, Turquia, por ter concedido o extrato de *Dittrichia viscosa*, usado nesta investigação.

Ao meu amigo Billy, por todas as horas passadas no Skype, em que teve paciência de me aturar. Agradeço por todas as gargalhadas e lágrimas, que nos momentos mais desencorajantes deram força para continuar.

Por último, e não menos importante, antes pelo contrário, um especial obrigado aos meus pais e família pela possibilidade de todo o meu percurso académico, pelo esforço, apoio e amor. Família única!

**OBRIGADO!**

## Abstract

On a daily basis our genome is constantly under attack by various endogenous and exogenous agents. Among these agents are mutagens, which provoke DNA based mutations which may alter the normal mechanisms of cells and therefore give rise to many diseases, including cancer. Many of these agents are environmental, mainly found in tobacco, or alcohol, or clinical and illicit drugs. One of the biggest challenges nowadays is uncovering new compounds/drugs with the potential to treat degenerative diseases such as cancer or improve the quality of life along ageing. Resistance to therapy is frequent in cancer therapy, which drives the researchers to look for new molecules with new anticancer mechanisms and with lesser side effects. The scientific community is now focusing on medicinal plants, used by our ancestors in the past, due to their bioactive compounds such as alkaloids, terpenes and phenols.

The main objective of this work was to assess the protecting effect of extracts from *Ginkgo biloba* (GB), *Dittrichia viscosa* (IV) and *Melissa officinalis* (MO), against 2 genotoxic agents, camptothecin (CPT) and sodium nitroprusside (SNP). All experiments to verify the protective capabilities of the biological extracts obtained from these plants were performed on two distinct yeast biological models *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Viability assays were performed, by exposing the organisms to the genotoxins (CPT and SNP) and a plant extract to study protection against cytotoxicity. The same approach was used to investigate the anti-genotoxic effects using the comet assay, only on *S. cerevisiae*. In addition, viability assays were performed on *Sch. pombe* mutant strains affected in DNA repair mechanisms. Our results suggest that CPT and SNP are substances that lead to loss of cellular viability and that cause DNA damage, as verified in viability assays and comet assay. The extracts from GB and IV were efficient protectors against CPT. This protection may be induced through improvement of homologous recombination, taking in consideration that neither GB nor IV protected mutants affected in this repair pathway. Concerning SNP, the increased loss of viability observed in the presence of extracts from GB and MO suggest that these extracts have a synergistic effect. The IV extract on the other hand seemed to protect the cells from cytotoxicity upon SNP exposure. *Sch Pombe* throughout the experiments proved to be a better model than *S. cerevisiae* to study CPT and SNP cytotoxicity.

## Resumo

No nosso dia-a-dia a estabilidade do nosso genoma está constantemente a ser atacada por vários agentes provenientes de fatores endógenos e exógenos, ao organismo. De entre estes agentes encontram-se os mutagénios químicos que causam mutações ao nível do DNA, por meio de reações químicas, o que pode alterar os mecanismos normais das células e consequentemente originar muitas doenças, nomeadamente cancro. Estes agentes estão presentes no ambiente, mas derivam essencialmente de drogas, como tabaco, álcool e substâncias ilícitas, e fármacos clínicos. Um dos grandes desafios, hoje em dia, é a exploração de novos agentes, que possam tratar uma variedade de doenças degenerativas ou melhorar a qualidade de vida em idades avançadas. A resistência à terapia é frequente na quimioterapia do cancro, impulsionando grupos de investigação na procura de novos compostos com novos mecanismos de ação anti cancro e com menos efeitos secundários. Assim, a comunidade científica centrou-se na exploração de plantas medicinais, usadas já pelos nossos antepassados, para fins curativos, devido aos seus compostos biologicamente ativos. De entre esses compostos, destacam-se os alcalóides, os terpenos e os fenóis. Estes compostos podem causar efeitos benéficos, pois estão associados a diversas atividades, das quais a atividade antioxidante, anticancerígena e antigénotoxicidade são as mais frequentes, mas os mecanismos responsáveis por estas e outras atividades reportadas estão por aprofundar. Portanto, o nosso objetivo focou-se no estudo da atividade protetora de extratos vegetais, como extrato de *Ginkgo biloba* (GB), *Dittrichia viscosa* (IV) e *Melissa officinalis* (MO), contra stresse genotóxico provocado por dois agentes químicos, camptotecina (CPT) e nitroprussiato de sódio (SNP). Os ensaios foram realizados em dois modelos biológicos diferentes: na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e na levedura *Schizosaccharomyces pombe*. Para investigar os efeitos protetores dos diferentes extratos, nos dois modelos biológicos, efetuaram-se ensaios de viabilidade, juntamente com camptotecina e nitroprussiato de sódio. O efeito antigénotóxico foi testado através do ensaio cometa, apenas na levedura *S. cerevisiae* e os mecanismos de proteção dos extratos envolveu a determinação da viabilidade celular, em estirpes mutantes, da levedura *Sch. pombe*, afetadas em mecanismos de regulação e reparação da resposta a danos de DNA. Os nossos resultados sugerem que CPT e SNP são substâncias que levam à perda de viabilidade celular e provocam danos no DNA, como se verificou nos

ensaios de viabilidade e ensaio cometa. Os extrato de GB e IV mostraram proteção contra CPT, podendo essa proteção ser por indução da recombinação homóloga, como sugerem os resultados de ausência de proteção em mutantes afetados nesta via de reparação de DNA. Relativamente ao SNP, os extratos de GB e MO apresentam um efeito sinérgico, ou seja, potencializam o efeito do SNP quando adicionados em conjunto, como se observou no aumento da perda de viabilidade, enquanto que o extrato de IV parece proteger as células danificadas pelo SNP. A levedura *Sch. pombe* mostrou ser um melhor modelo para este ensaio do que a levedura *S. cerevisiae*.

# Índice

1 - Introdução.....	1
1.1 - Stresse genotóxico e integridade genómica .....	1
1.2– Reparação do DNA .....	7
1.3 - Ação antigenotóxica através do uso de fitoquímicos, de extratos vegetais.....	11
2– Modelos Biológicos.....	18
2.1– Leveduras como modelo biológico.....	19
3– Objetivos deste trabalho .....	22
4– Materiais e métodos .....	24
4.1– Modelos biológicos, meios e condições de crescimento .....	24
4.2– Extratos vegetais .....	25
4.3– Ensaio de viabilidade/suscetibilidade celular, com a estirpe BY4741 .....	27
4.4– Ensaio de viabilidade celular, com a estirpe 972h <sup>-</sup> .....	28
4.5– Ensaio cometa, com BY4741 .....	30
4.6 - Análise estatística.....	31
5 – Resultados, com o modelo biológico <i>S. cerevisiae</i> .....	31
5.1- Efeitos de extratos vegetais, GB, IV e MO sobre a viabilidade celular sob condições de stresse genotóxico, provocado pelo CPT .....	31
5.2- Efeitos de extratos vegetais, GB, IV e MO sobre a viabilidade das células sob condições de stresse genotóxico, provocado pelo SNP .....	35
5.3 – Extrato de GB protege as células de danos do DNA, provocados por CPT e SNP .....	39
6 – Resultados, com o modelo biológico <i>Sch. pombe</i> .....	41
6.1- Efeitos de extratos vegetais, GB, IV e MO sobre a viabilidade das células sob condições de stresse genotóxico, provocado pelo CPT .....	41
7 – Discussão .....	49
8 - Conclusão .....	53
9 – Perspetivas Futuras .....	53
10 – Referências Bibliográficas.....	55

## **Lista de abreviaturas:**

**BER** – mecanismo de reparação por excisão de bases

**CFU's** – unidades formadoras de colónias

**cGMP** – guanosina monofosfato cíclico

**CPT** – camptotecina

**Cys** – cisteína

**dH<sub>2</sub>O** – água desionizada

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

**DP** – desvio padrão

**DSB** – quebra de cadeia dupla de DNA

**eNOS** – sintase oxido nítrico endotelial

**GB** – *Ginkgo biloba*

**ICL** – mecanismo de reparação por ligação cruzada

**iNOS** – sintase oxido nítrico indutível

**iRNA** – RNA de interferência

**IV** – *Dittrichia viscosa*

**LMA** – low melting agarose

**MMR** – mecanismo de reparação mismatch

**MO** – *Melissa officinalis*

**NER** – mecanismo de reparação por excisão de nucleótidos

**NMA** – normal melting agarose

**nNOS** – sintase oxido nítrico neuronal

**NO** – oxido nítrico

**NOS** – sintase do oxido nítrico

**RH** – recombinação homóloga

**RNS** – espécies reativas de azoto

**ROS** – espécies reativas de oxigénio

**RS** – espécies reativas

***S. cerevisiae*** – levedura *Saccharomyces cerevisiae*

***Sch. pombe*** – levedura *Schizosaccharomyces pombe*

**SNP** – nitroprussiato de sódio

**Topo I** – topoisomerase I

**upH<sub>2</sub>O** – água ultra pura

**UV** – ultra violeta

**Wt** – estirpe selvagem

**YPD** – meio de cultura rico para leveduras: yeast extract, peptone, dextrose

## **Lista de Conteúdos**

**Figura 1.1** - Reação de Fenton e Waber – Weiss.

**Figura 1.2** - Estrutura química da Camptotecina.

**Figura 1.3** - Mecanismo de ação de Camptotecina.

**Figura 1.4** - Estrutura química do Nitroprussiato de Sódio.

**Figura 1.5** - Síntese do NO, a partir de L-arginina e oxigénio, através de NOS (adaptado 77).

**Figura 1.6** - Danos no DNA e mecanismos de reparação.

**Figura 1.7** - Via de reparação de quebras de cadeia dupla de DNA por recombinação homóloga.

**Figura 1.8** - Estrutura dos alcaloides cafeína e nicotina (adaptado 39).

**Figura 1.9** - Estrutura de alguns terpenos.

**Figura 1.10** - Estrutura de alguns compostos fenólicos.

**Figura 1.11** - Planta *Ginkgo biloba*

**Figura 1.12** - Planta *Dittrichia viscosa*

**Figura 1.13** - Planta *Melissa officinalis*.

**Figura 2.1** - Levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

**Figura 2.2** - Levedura *Schizosaccharomyces pombe*.

**Figura 5.1** - As células de *S. cerevisiae*, da estirpe BY4741, são suscetíveis ao CPT.

**Figura 5.2** - Viabilidade celular na presença de CPT e de CPT com extratos de GB, IV ou MO, de *S. cerevisiae*, da estirpe selvagem BY4741.

**Figura 5.3** - Viabilidade celular na presença de SNP e de SNP com extratos de GB, IV ou MO, de *S. cerevisiae*, da estirpe selvagem BY4741.

**Figura 5.4** - Viabilidade celular na presença de SNP e de SNP com extrato de GB, de *S. cerevisiae*, da estirpe selvagem BY4741.

**Figura 5.5** - O tratamento de células *S. cerevisiae*, BY4741, com GB protege o DNA contra danos genotóxicos causados por CPT e SNP.

**Figura 6.1** - Viabilidade celular na presença de CPT e de CPT com extratos de GB, IV ou MO, de *Sch. pombe*, da estirpe 972h<sup>-</sup>.

**Figura 6.2** - Extratos de GB e IV protegem as células, de *Sch.pombe* da estirpe 972h<sup>-</sup> e do mutante *chk1*, de stresse genotóxico induzido por CPT.

**Figura 6.3** - Viabilidade celular na presença de SNP e de SNP com extratos de GB, IV ou MO, de *Sch. pombe*, da estirpe 972h<sup>-</sup>.

**Figura 6.4** - Viabilidade celular na presença de SNP e de SNP com extratos de GB, IV ou MO, de *Sch. pombe*, da estirpe 972h<sup>-</sup> e as estirpes mutantes, *rhp51*, *rad51* e *chk1*.

**Tabela 1.1** - Diferentes espécies reativas de oxigénio e de azoto (adaptado 76).

**Tabela 1.2** - Genes essenciais dos principais mecanismos de reparação de DNA (adaptado 11).

**Tabela 4.1** - Tabela resumo dos genótipos, das estirpes, dos modelos biológicos *S. cerevisiae* e *Sch. pombe*.



## 1 - Introdução

### 1.1 - Stresse genotóxico e integridade genómica

Desde a descoberta da estrutura molecular do ácido desoxirribonucleico (DNA), por volta de 1953 [1] que a atenção de muitos investigadores é perceber e dar a conhecer os mecanismos por detrás desta molécula. O DNA contém a informação que é transmitida às gerações seguintes, sendo importante a estabilidade do genoma para a garantia da sobrevivência das espécies. As células vivas estão constantemente a ser sujeitas a agentes provenientes de fatores exógenos e endógenos ao organismo [2]. Surgiram e foram selecionados mecanismos de proteção e reparação que permitem a preservação da integridade do genoma, mas quando os danos são irreversíveis ocorre morte celular, por apoptose [3]. Estes danos ao nível do genoma são provocados por agentes genotóxicos, químicos, físicos ou biológicos [4]. Assim, o stresse genotóxico é qualquer substância ou agente genotóxico com afinidade para interagir com o DNA e provocar danos na sua integridade. Estas substâncias e agentes genotóxicos podem ser endógenos, ou seja, resultantes do metabolismo celular, ou podem ser de fontes exógenas, tais como radiações ultravioleta (UV), stresse oxidativo e/ou stresse nitrosativo ou mutagénios químicos [3].

A integridade genómica pode, assim, ser constantemente desafiada por agentes exógenos, como o ambiente e/ou por produtos resultantes do metabolismo celular, que podem gerar stresse genotóxico, logo uma resposta celular é selecionada para permitir a deteção, sinalização e reparação dos danos gerados no DNA [5].

O stresse oxidativo é um processo biológico onde há desequilíbrio entre o excesso de espécies reativas (RS) e o sistema de defesa do organismo. RS são estruturas muito instáveis e muito reativas e advêm de fontes internas, como metabolismo do organismo ou de fontes externas, como poluição do ar, tabagismo, consumo de álcool, radiação e exercício físico. É de salientar que RS são imprescindíveis ao organismo, só que em concentrações excessivas ao seu limite, ou seja, quando o número de RS produzido excede a capacidade antioxidante da célula, podem ter efeitos prejudiciais. Assim, RS de maior relevância são as espécies reativas de oxigénio (ROS) e as espécies reativas de azoto (RNS) [6].

ROS derivam do oxigénio molecular ( $O_2$ ), considerado, por muitos investigadores, uma das genotoxinas mais fortes [7]. Uma das ROS mais abundantes é o anião superóxido

( $\cdot\text{O}_2^-$ ), mas a mais prejudicial são os radicais hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) gerados pela reação de Fenton e de Haber-Weiss (Figura 1.1) [6]. Os principais problemas provocados por esta categoria de RS são as interrupções de vias de sinalização, danos de macromoléculas, perturbação da homeostase [6] e ainda genotoxicidade. Os danos genotóxicos vão desde oxidação de bases de DNA, fragmentação/quebras do DNA, mas o efeito mais nocivo, do dano oxidativo, ao nível do DNA, é a formação de quebras de cadeia dupla (DSB`s) [7].

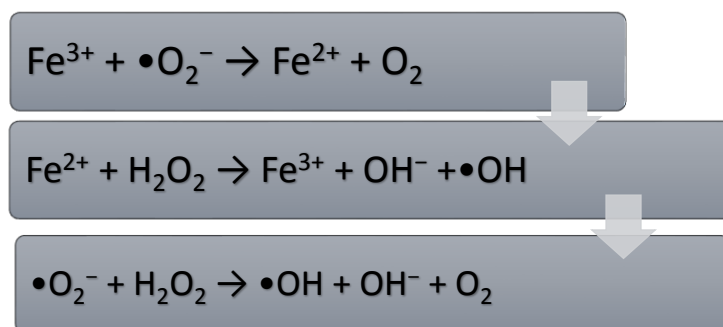


Figura 1.1 - Reação de Fenton e Waber – Weiss.

Das RNS, a mais comum é óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) que reage com o  $\cdot\text{O}_2^-$ , dando origem ao anião peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que, por sua vez, é convertido em ácido peroxinitroso e, por fim, resulta em  $\cdot\text{OH}$  e anião nitrito ( $\cdot\text{NO}_2^-$ ), resultando assim em stresse oxidativo [6]. Tanto ROS como RNS (Tabela 1.1) são essenciais e fisiologicamente produzidos, pelas células do organismo, durante os processos metabólicos e, essencialmente, durante o processo de transporte de eletrões. RNS em conjunto com ROS estão na primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores potencialmente patogénicos, daí RNS e ROS serem considerados eficazes como agentes antimicrobianos [8].

Tabela 1.1 - Diferentes espécies reativas de oxigénio e de azoto (adaptado de [76]).

ROS	Símbolo	RNS	Símbolo
Hidróxido	OH·	Óxido nitroso	NO·
Superóxido	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Peroxinitrato	OONO·
Óxido nítrico	NO·	Ácido peroxinitroso	ONOOH
Peróxido	RO <sub>2</sub> ·	Anião nitroxido	NO <sup>-</sup>
Peróxido lipídico	LOO·	Dióxido de nitrogénio	NO <sub>2</sub> ·
Peroxinitrato	ONOO·	Trióxido de dinitrogénio	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Peróxido de hidrogénio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ácido nitroso	HNO <sub>2</sub>
Oxigénio singlete	<sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	Cloreto de nitrilo	NO <sub>2</sub> Cl
Ácido hipoclorídrico	HOCL	Catião nitrosil	NO <sup>+</sup>

Existem ainda os mutagénios químicos que são substâncias que causam mutações, ou seja, alterações, ao nível do DNA e informação genética, por meio de uma reação química, o que pode alterar os mecanismos normais das células e consequentemente originar muitas doenças, principalmente células cancerígenas. A exposição a estes agentes pode ocorrer através da alimentação, água, ar, drogas (tabaco, álcool e substâncias ilícitas) e fármacos clínicos [9]. De entre as substâncias mutagénicas, por exemplo, nas alimentares destacam-se as aflatoxinas, N-nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas heterocíclicas, que causam diferentes tipos de danos no DNA, como alterações de nucleótidos e aberrações cromossómicas [10], mas os principais agentes químicos mutagénicos encontram-se nos fármacos clínicos que têm sido desenvolvidos ao longo dos anos. Estes fármacos têm como alvo o DNA e são um meio de tratamento de inúmeras doenças, nomeadamente o cancro, e apresentam na sua constituição agentes de alquilação de bases do DNA, agentes de alquilação bifuncionais (compostos de platina, mitomicina C e mostardas de azoto) que formam ligações cruzadas intra e intercadeia do DNA, provocando danos. Existe ainda os fármacos usados na quimioterapia que levam mesmo a quebras de cadeia de DNA, como o caso dos inibidores de topoisomerase I e II.

Um exemplo deste tipo de quimioterápicos é a camptotecina (CPT) [11]. As espécies reativas, também estão envolvidas nos agentes mutagénios químicos, porque estão implicadas na iniciação e progressão de várias doenças e na toxicidade de vários produtos químicos [12], como é o caso, por exemplo, do nitroprussiato de sódio (SNP).

### 1.1.1– Camptotecina

A camptotecina (CPT) é uma substância química isolada originalmente da planta *Camptotheca acuminata*. Quimicamente é considerada um alcalóide pentacíclico insaturado, com um sistema de anéis quinolónicos (A e B), um anel piridona (D) e um  $\alpha$ -hidroxilactona (E) [13].

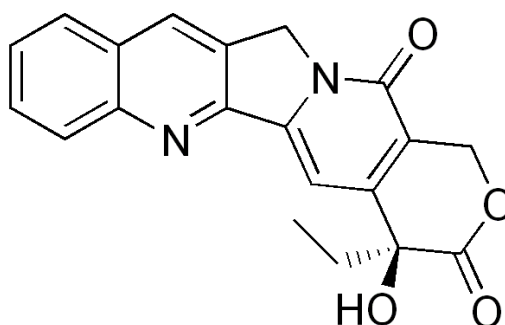


Figura 1.2 - Estrutura química da Camptotecina (Autor: Edgar 181)

CPT e os seus derivados são agentes importantes no tratamento e investigação de doenças malignas, como tumores sólidos [14] e doenças hematopoiéticas [15]. Este agente quimioterápico é de relevância para muitos investigadores, principalmente, porque um dos modos de atuação pode ser através da ativação da apoptose, visto que são relatados vários estudos que indicam que CPT induz apoptose em várias células cancerígenas [15]. CPT é uma droga que quando em contacto com as células provoca stresse genotóxico, isto porque, inibe a topoisomerase I (topo I), fazendo com que as células parem na fase S, do ciclo celular [16]. Topo I tem como principal função o relaxamento do DNA superenrolado, produzido pela tensão de torção durante a replicação e transcrição. Assim, a topo I liga-se ao DNA formando um complexo de clivagem que permite a continuação do processo de separação das cadeias de DNA [17]. Quando administrado CPT às células, esta liga-se ao complexo de clivagem (Fig. 4), estabilizando-o, o que resulta numa rutura irreversível do DNA, pois provoca a rutura da dupla cadeia do DNA, ou seja, DSB's. Não há replicação nem transcrição, havendo morte celular [16, 17]. Este tipo de danos, causados por topo I, também necessita de ser reparado, para conservar a integridade do genoma [14].

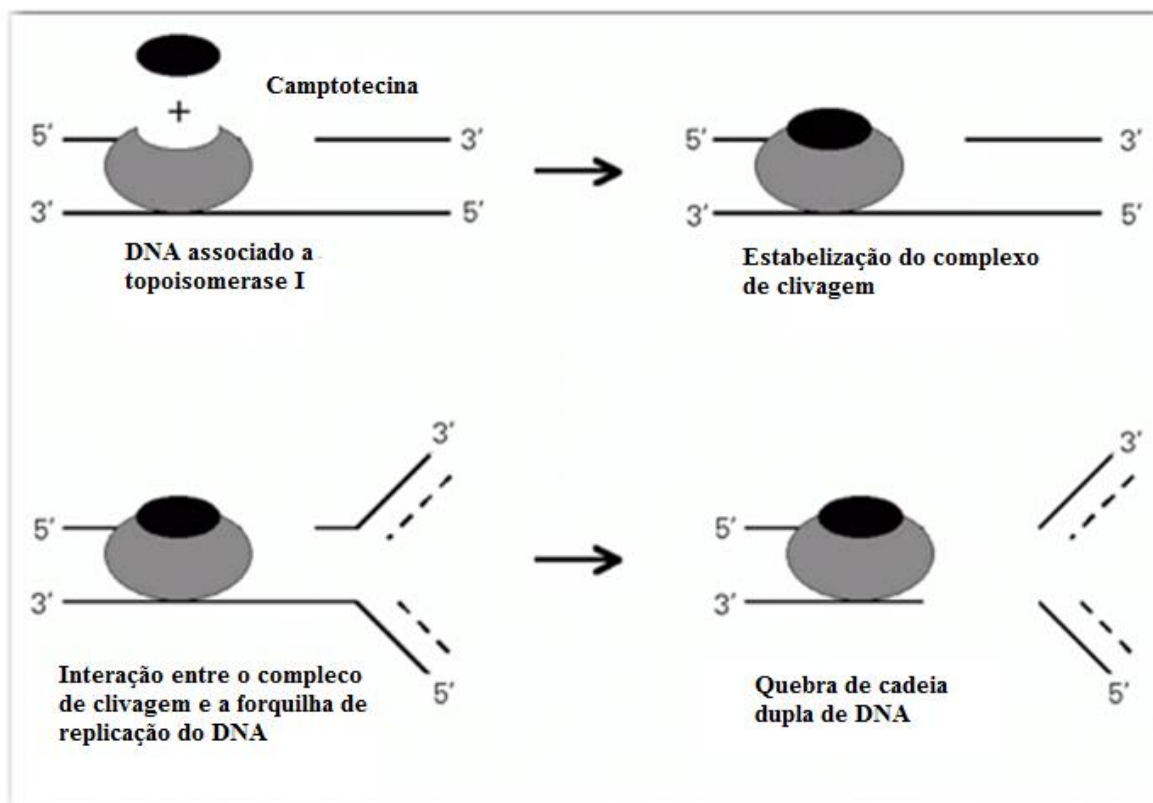


Figura 1. 3 - Mecanismo de ação de Camptotecina (adaptado [78]).

Apesar do grande interesse, pela comunidade científica, nesta molécula, tem sido difícil estudá-la, porque esta droga atua como um inibidor não competitivo e liga-se apenas a um complexo covalente transiente [16]. Além de que, CPT é uma molécula com certos inconvenientes como baixa solubilidade em soluções aquosas, apresenta uma grande toxicidade irreversível, provocando, em alguns casos, efeitos secundários como cistites hemorrágicas, apresenta instabilidade da lactona, presente na sua estrutura. [17].

### 1.1.2– Nitroprussiato de Sódio e óxido nítrico

O nitroprussiato de sódio (SNP) é um sal que liberta óxido nítrico (NO). É um composto químico sensível à luz solar e considerado um vasodilatador anti – hipertensivo de ação rápida (tempo de meia vida de um a dois minutos) após descontinuação e referenciado num estudo como tratamento coadjuvante para esquizofrenia [18]. Apresenta toxicidade,

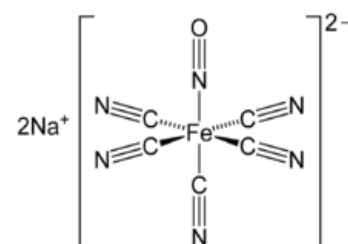


Figura 1.4 - Estrutura química do Nitroprussiato de Sódio (Autor: Bejah-bmm27).

devido à produção gradual de cianeto, que se agrega com o ferro (Fe) dos citocromos mitocondriais inibindo a produção de ATP nas células [19]. O seu mecanismo de ação é comum a todos os nitritos.

O NO é um radical livre altamente difusível que se apresenta na forma de gás solúvel e lipofílico, com funções reguladoras em vários eventos fisiológicos e patológicos [19]. Considera-se que NO é uma molécula de sinalização intra e inter-celular importante no sistema nervoso, imunológico e cardiovascular [20]. Vários estudos relatam que o NO desencadeia uma sequência de acontecimentos como morte celular programada, que levam à defesa do organismo, em resposta a indutores ou agentes patogénicos [21] e que uma grande quantidade de NO é libertada pelas células do sistema imunitário, quando o organismo sofre infeções por diversos organismos, desde bactérias e fungos patogénicos, parasitas e vírus [8]. Outros estudos mostram que o NO é um mensageiro neuronal, que em excesso pode causar eventos neurotóxicos, havendo mesmo morte neuronal [22]. No organismo, o NO, é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina e O<sub>2</sub> na reação catalisada pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS) (Figura 1.5) [19,20,23].

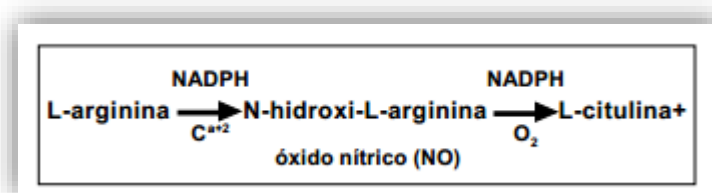


Figura 1.5 - Síntese do NO, a partir de L-arginina e oxigênio, através de NOS (adaptado de [77]).

Existem três isoformas de NOS: a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e indutível (iNOS), que compartilham a mesma estrutura de domínio e mecanismo catalítico e diferem nas propriedades reguladoras. Como tal torna-se necessário compreender a contribuição dos diferentes tipos de NOS's nos processos biológicos e patológicos, para se conseguir efeitos promissores [19,20]. Como mecanismo de ação, o NO atua por duas principais vias, ou seja, tem capacidade de, em baixas concentrações, ativar a guanil ciclase, levando à regulação da guanosina monofosfato cíclica (cGMP) [8], que por sua vez atua como um segundo mensageiro que regula inúmeros processos celulares [24], e ainda pode interagir com a citocromo C-oxidase (principal fonte do anião superóxido), na mitocôndria, provocando

stresse oxidativo, quando em concentrações excessivas [23,25]. Assim, o NO pode reagir com diferentes espécies, dentro do hospedeiro, originando RNS, podendo inibir a cadeia respiratória [8]. Está também descrito que esta molécula também controla a cascata de sinalização da apoptose, pela disfunção da regulação da expressão genética, disfunção mitocondrial e ativação das caspases, sendo que este mecanismo ainda não está muito bem compreendido, apesar de que a S-nitrosação, conhecida por controlar importantes funções celulares através da modificação de resíduos tióis de cisteínas (Cys) pela ligação covalente do NO, é fundamental para manter as caspases na sua forma inativa [26]. Resumidamente, o óxido nítrico é uma molécula que apresenta uma ação dupla no organismo, ou seja, quando presente em baixas concentrações pode apresentar-se como um mecanismo de defesa, enquanto em concentrações elevadas leva à morte celular [24].

## 1.2– Reparação do DNA

Como já percebemos, o genoma de qualquer organismo, seja microrganismos, animais ou até mesmo plantas está constantemente a sofrer danos devido ao seu próprio metabolismo ou por fatores externos ao organismo. As lesões ao nível do DNA podem gerar inúmeros problemas desde distorções estruturais, que interferem com processos celulares, como transcrição e replicação, a mutações, tudo que interfere com a estabilidade do genoma e mesmo morte celular. Ao longo dos anos os organismos foram evoluindo e adaptando-se consoante as necessidades, e por uma questão de sobrevivência, desenvolveram vários sistemas de reparação do DNA, para lidar com os danos, que todos os dias, põem à prova a estabilidade do genoma. Os muitos mecanismos de reparação de DNA que as células apresentam são: reparação por excisão de bases (BER), reparação por excisão de nucleótidos (NER), *mismatch* (MMR) e ainda reparação por ligação cruzada (ICL) [27]. Outro dos mecanismos de reparação, que as células apresentam, é a recombinação homóloga (RH) por meio da rutura da cadeia dupla do DNA (DSB) (Figura 1.6). AS DSB e RH dependem da expressão de um mesmo grupo de genes, indicação esta que permite diferir que têm uma bioquímica comum. Mas não são só as DSB's que levam à RH. Há outro tipo de lesões e processos celulares que também podem resultar em recombinação homóloga. É necessário recombinação homóloga, por exemplo, no processo de meiose, pois desempenha a importante função da correta segregação dos pares de cromossomas homólogos, através da troca

reciproca de material genético [28]. O processo de *switching do mating type* de leveduras é, outro exemplo, que induz recombinação homóloga [29]. Apesar da recombinação homóloga ser um processo que difere de organismo para organismo, o mecanismo básico é o mesmo e é um processo bastante conservado, em eucariotas.

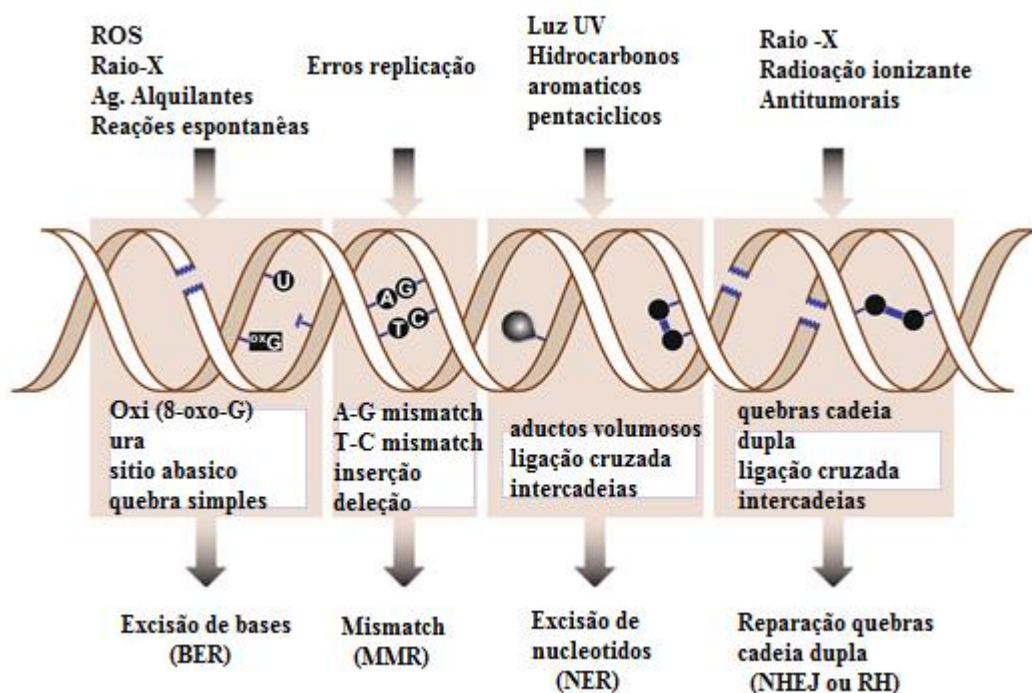


Figura 1.6 - Danos no DNA e mecanismos de reparação. O diagrama ilustra agentes prejudiciais ao DNA, exemplos de lesões causadas por esses agentes e o mecanismo de reparo responsável pela sua remoção [adaptado 11].

O mecanismo de recombinação homóloga, em eucariotas, inicia-se com o reconhecimento de DSB, que é processado por excisão nucleofílica que origina cadeias simples com caudas 3'-OH. O início deste processo é mediado por um complexo heterodimérico MRN (Mre11-Rad50-Nbs), juntamente com CtIP (RBBP8) e continua através da ação de BLM helicase e a exonuclease Exo1. As caudas 3' estão vinculadas por RPA, até à remoção de estruturas secundárias disruptivas. De seguida RPA é substituído por Rad51, proteínas mediadoras, Rad52 e BRCA2 e um grupo de proteínas paralogas a Rad51, para executarem a pesquisa de homologia de sequências de DNA. Após a identificação de DNA homólogo, Rad51 medeia a invasão do modelo de DNA de cadeia dupla (cromátídeos irmãos)

pela cadeia de DNA danificada. Por fim, dá-se a síntese de DNA, através de DNA polimerase seguido da ligação sucessiva, através do DNA helicase I e obtém-se uma estrutura intermediária conhecida como junção de Holliday, que origina produtos crossover ou noncrossover, sem erros (Figura 1.7) [11, 30].

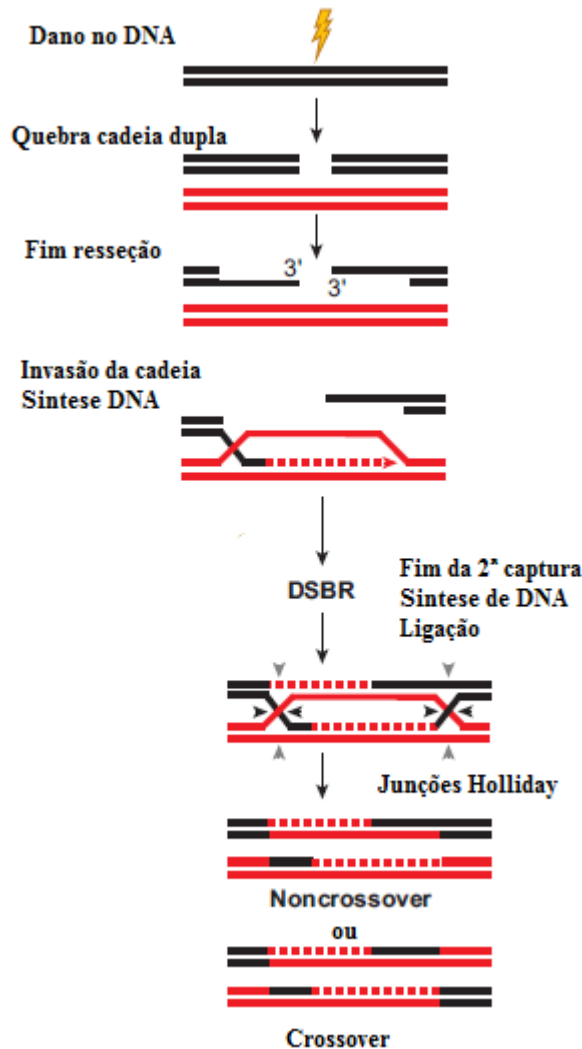


Figura 1.7 - Via de reparação de quebras de cadeia dupla de DNA por recombinação homologa. Após a formação de DSB's, as extremidades 3' são removidas, para se obter cadeias simples de DNA, que se tornam substrato para que a maquinaria de RH execute a invasão de um cromossoma homólogo. Após a pesquisa de homologia dá-se a invasão e forma-se um D-loop, seguido da síntese de DNA. A segunda extremidade pode ser capturada de modo a formar um intermediário que abriga junções Holliday, acompanhada de síntese de DNA e preenchimento das lacunas. HJ através de uma endonuclease pode resultar em produtos não crossover ou produtos crossover, livres de erros (adaptado de [30]).

Assim, a RH têm um grande papel quando se trata da integridade do genoma. Como tudo, RH também apresenta adversidades e neste caso a recombinação homóloga pode gerar perda de

heterozigidade. O ponto positivo é que esta perda torna-se importante para a investigação quando se trata de tumorigénese em eucariotas superiores, logo torna-se relevante compreender os tipos de danos de DNA mais eficazes que originam RH [31].

A resposta aos danos de DNA envolvem certas vias como a via PKC juntamente com ATM, que estão mais envolvidas na reparação de DSB's e a ATM, sozinha, apresenta-se mais como via de reparação de lesões associadas à replicação. Apesar de se tratar de vias de reparação, existem falhas que remetem novamente para a instabilidade do genoma e para as doenças [27].

A ciência tem assim um grande caminho pela frente, de extrema importância, porque se conhecem muitos mecanismos celulares, mas de uma forma geral, sendo necessário aprofundar para dar resposta às adversidades que sofre a molécula biológica, presente em todas as células vivas, que nos confere identidade, o DNA.

Tabela 1.2 - Genes essenciais dos principais mecanismos de reparação de DNA (adaptado de [11]).

<b>Reparação por excisão de bases (BER)</b>	DNA glicosilase, APE1, XRCC1, PNKP, Tdp1, APTX, DNA polimerase $\beta$ , FEN1, DNA polimerase $\delta$ ou $\epsilon$ , PCNA-RFC, PARP
<b>Reparação mismatch (MMR)</b>	Mut $\alpha$ (MSH2-MSH6), Mut $\beta$ (MSH2-MSH3), Mut $\gamma$ (MLH2-MLH3), Mut $\delta$ (MLH1-PMS2), Mut $\epsilon$ (MLH1-MLH3), Exo1, PCNA-RFC
<b>Reparação por excisão de nucleótidos (NER)</b>	XPC-Rad23B-CEN2, UV-DDB, (DDB1-XPE), CSA, CSB, THIIH, XPB, XPD, XPA, RPA, XPG, ERCC1-XPF, DNA polimerase $\delta$ ou $\epsilon$
<b>Recombinação homóloga (RH)</b>	Mre11-Rad50-Nbs1, CtIP, RPA, Rad51, Rad52, BRCA1, BRCA2, Exo1, BLM-TOPIII $\alpha$ , GEN1-Yen1, Slx1-SLx4, Mus81/Eme1
<b>Recombinação não homóloga (NHEJ)</b>	Ku70-Ku80, DNA-PKc, XRCC4-DNA ligase IV, XLF

### **1.3 - Ação antígeno-tóxica através do uso de fitoquímicos**

Com a descoberta dos factos e eventos exógenos e endógenos do DNA e das suas consequências a indústria farmacêutica teve um grande avanço. Hoje em dia, devido a questões económicas, ambientais, resistências a medicamentos e entraves (alvos específicos, principal causa da doença, mutações, entre outros) relacionados a muitas doenças, tornou-se necessário descobrir e caracterizar novos recursos, neste caso naturais. Estes produtos naturais são produzidos por seres vivos dos vários reinos. São todos compostos orgânicos e são fruto dos processos metabólicos primários como aminoácidos, proteínas e lípidos, que estão envolvidos em processos celulares [32, 33]. E ainda nos processos metabólicos secundários que produzem compostos biologicamente ativos (compostos fenólicos, alcalóides, terpenos, esteroides, saponinas, entre outros) como resposta a estímulos bióticos ou abióticos a que são sujeitos [34]. Por tais razões, o reino vegetal tomou outras proporções, no mundo da investigação. O estudo da medicina tradicional renasceu em diferentes partes do mundo. Uma das curiosidades é que 80% da população, nos dias de hoje, depende da medicina tradicional para os cuidados de saúde primários, sendo que a maioria envolve extratos vegetais [34]. Isto ocorre principalmente nos países em vias de desenvolvimento, porque as plantas são mais económicas e mais acessíveis do que a medicina ortodoxa. As plantas ocupam agora uma posição de extrema importância em muitos ramos da medicina, desde medicina alopática, fitoterápica, homeopática e aromoterápica, como no mundo da investigação [32, 33]. O uso moderno da medicina tradicional que usa extratos vegetais é limitado, devido à falta de conhecimento da bioquímica e efeitos secundários e toxicológicos e para se promover medicamentos à base de substâncias naturais provenientes de plantas é necessário o estudo e seleção de plantas e dos seus metabolitos, principalmente secundários, os conhecidos produtos naturais ou compostos bioativos ou ainda fitoquímicos. Há ainda outra questão relevante, relacionada com os extratos vegetais, que é o facto de que os que já são comercializados são extratos padronizados. Isto torna-se num problema, porque os extratos são misturas complexas, sendo a padronização referente apenas às concentrações dos compostos considerados mais ativos. Assim, estes extratos não deixam de ser quimicamente indefinidos e em que as concentrações de muitos dos seus componentes variam de lote para lote e de fabricante para fabricante. Os compostos bioativos desempenham inúmeras funções, essencialmente de proteção, eliminam radicais livres, são antioxidantes, absorvem radiações UV, e defendem contra bactérias, fungos e vírus. Apesar destes compostos combaterem o

dano oxidativo se não forem administrados nas concentrações e tempos certos pode haver ainda mais danos, pois os antioxidantes atuam como pro-oxidantes [6]. Pro-oxidantes são as substâncias que provocam stresse oxidativo tanto pela formação de espécies reativas como através da inibição de sistemas antioxidantes [35]. Há substâncias que atuam como antioxidantes, mas consoante as circunstâncias podem ter o papel contrário, ou seja, exercer funções pro-oxidantes [36]. Os fitoquímicos podem ser agrupados pela natureza química dos seus componentes ativos, sendo que os grupos com mais interesse são: os alcalóides, os terpenos e os compostos fenólicos.

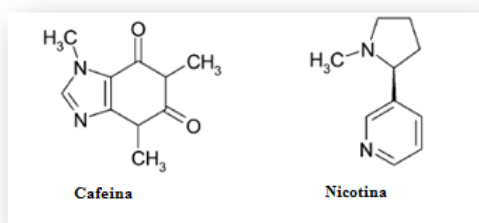


Figura 1.8 - Estrutura dos alcalóides cafeína e nicotina (adaptado de [39]).

Os alcalóides são um grupo heterogéneo de compostos cíclicos derivados de bases orgânicas nitrogenadas. No reino vegetal são produzidos por cerca de 20% das espécies [39]. Em relação às suas características fazem parte da maioria dos venenos, neurotoxinas, psicóticos tradicionais, analgésicos, anestésicos, consumidos pelos seres humanos e como tratamento para inibir a colinesterase, para a desregulação colinérgica que leva a problemas neurológicos, como por exemplo a doença de Alzheimer. Por natureza, os alcaloides, principalmente os pirrolizidínicos, são tóxicos para mamíferos, porque derivam de mono ou diésteres de ácidos necina com uma base de necina que quando são insaturadas e ativam o seu metabolismo, através de citocromos, geram intermediários reativos que formam aductos que se ligam ao DNA, que provocam mutações e levam à genotoxicidade [37, 38]. Alguns exemplos de alcalóides presentes em extratos vegetais são a cocaína (estupefaciente), nicotina, morfina (analgésico potente), quinino (anti malárico), entre muitos outros [39].

Os terpenos são compostos solúveis em lípidos e hidrocarbonados que derivam de uma unidade básica simples, o isopreno. Assim, a sua classificação é dada consoante o número de unidades de isopreno que apresentam. Os terpenos são o grupo mais generalizado de produtos naturais. Apresentam atividades significativas antivirais, antibacterianas, anti-maláricas, anti-inflamatórias e têm capacidade de inibir a síntese do colesterol e atividade cancerígena. O mais conhecido dos terpenos é o limoneno (monoterpeno) e ainda os carotenóides. Muitos

estudos também mostram que os terpenos podem agir sinergicamente [34, 39]. Por exemplo, um estudo mostra o efeito sinérgico de terpenos quando combinado com hinoquitinol, um agente antibacteriano, porque os resultados mostram que o agente juntamente com terpenos, utilizados no estudo, possui um efeito inibidor contra as bactérias maior do que quando aplicado individualmente [40]. O efeito sinérgico é caracterizado por substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, mas que se combinadas adequadamente podem aumentar o efeito dos antioxidantes. Existem também antioxidantes que quando se combinam produzem um efeito sinérgico, em vez de antioxidante.

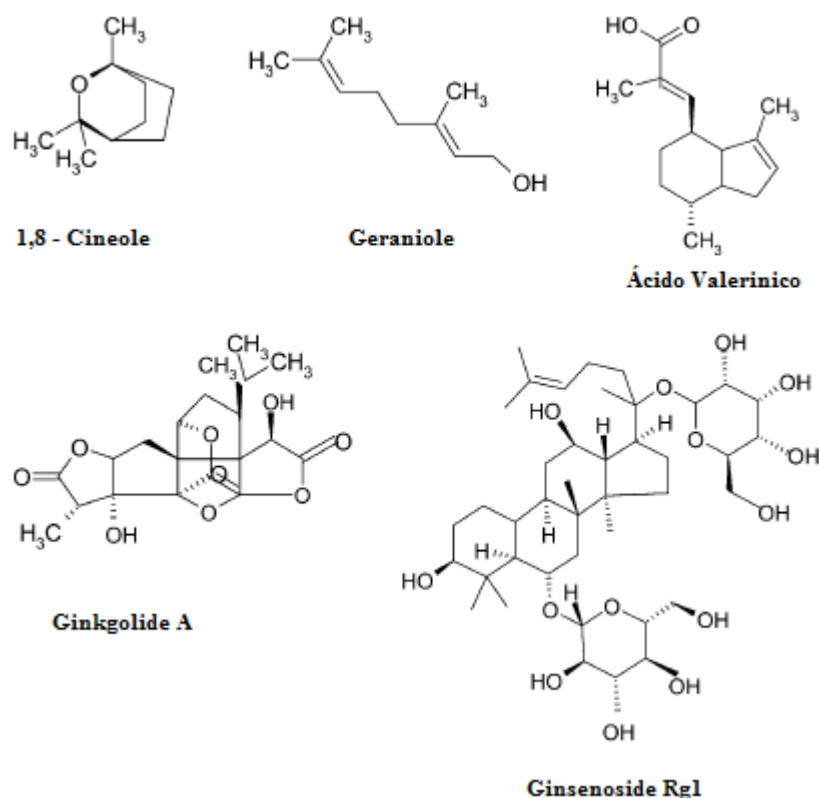


Figura 1.9 - Estrutura de alguns terpenos, incluindo o monoterpene 1,8 - cineol e geraniol, o sesquiterpene ácido valerínico, o diterpene Ginkgolide A e o triterpene Ginsenoside Rg1 (adaptado de [39]).

Os fenóis são encontrados por todo o reino vegetal e estruturalmente partilham, pelo menos, um anel de hidrocarboneto aromático com um ou mais grupos hidroxilo. Apresentam aplicações como precursores na síntese de aspirina e outros medicamentos, desinfetantes, entre muitas outras, e apresentam toxicidade quando são fenóis substituídos [41]. Os fenóis que são substituídos com grupos que libertam eletrões tornam-se extremamente tóxicos, porque podem formar radicais livres de fenóxilo e os que são substituídos com grupos capazes

de retirar elétrons torna-se tóxicos, através de lipofilicidade, ou seja, são rapidamente absorvidos pela pele, pulmões e trato gastrointestinal [42]. Os compostos fenólicos têm elevada afinidade para quelar metais e eliminar radicais livres. Podem ainda dividir-se em compostos de baixo peso molecular, como o caso das cumarinas e derivados do ácido benzoico e compostos mais complexos, mais importantes, os flavonóides e taninos. Os flavonóides são encontrados em frutas, legumes, cereais, cascas de troncos e ramos, raízes, caules, flores, chás e vinho. Estes podem ainda ser subdivididos em flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas, entre outros, consoante as modificações da sua estrutura. Têm capacidade de produzir fitoestrogénios que estão associados com o alívio dos sintomas da menopausa, osteoporose, colesterol e propriedades anticancerígenas. Conferem proteção ao sistema hormonal e neuronal, mas a sua principal característica é o poder antioxidante. Os taninos são solúveis em água e em álcool. Apresentam atividade analgésica, anti-inflamatória e promovem a cicatrização. Além de que ainda são bons sequestradores de radicais livres [34, 39].

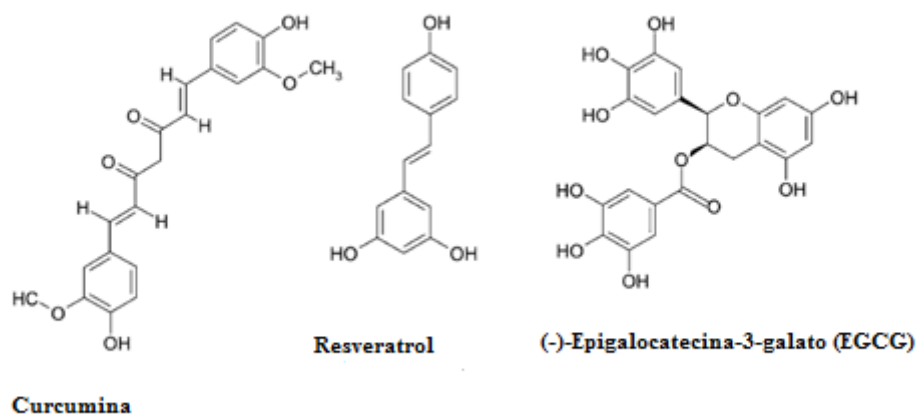


Figura 1.10 - Estrutura de alguns compostos fenólicos (adaptado de [39]).

O uso de extratos vegetais é assim uma boa estratégia natural para tentar combater os danos do DNA, principalmente pela maioria das espécies vegetais apresentar fitoquímicos com propriedades antioxidantes naturais que possam ajudar a capacidade antioxidante do organismo ou retardar a progressão de doenças associadas com ROS e outros agentes que

causam danos oxidativos, como mutações no DNA, que pode causar ou propagar o desenvolvimento de vários tipos de doenças, como por exemplo diabetes, cancro, doenças neurodegenerativas, entre outras.

### 1.3.1– Extrato vegetal de *Ginkgo biloba*



Figura 1.11 - Planta *Ginkgo biloba*  
(Autor: James Field)

A planta *Ginkgo biloba* L. (GB) é originária da China e pertence ao filo Ginkgophyta. Foi relatada pela primeira vez, em 1690 por um médico alemão, Engelbert Kaempfer, mas só teve interesse por volta de 1939-1945, por ter sobrevivido à bomba atômica em Hiroshima, na segunda Guerra Mundial. O extrato de GB tem sido usado na medicina chinesa há milhares de anos para melhorar a inteligência, como para tratamento de distúrbios neurológicos, doenças inflamatórias, problemas cardiovasculares e distúrbios pulmonares [43]. A importância do extrato de *G. biloba* deve-se aos seus componentes ativos, destacando-se: os flavonóides, principalmente antocianidinas e os terpenóides [44]. Estes principais componentes presentes no extrato conferem-lhe uma eficaz atividade antioxidante, propriedades anti tumorais, devido ao aumento da toxicidade em células de carcinoma, e ainda efeito de proteção, contra toxinas, do sistema nervoso, cerebral e vascular [45]. Outro dos efeitos benéficos do extrato de GB é que eliminam os radicais livres, inibem enzimas ou aumentam a atividade de outras enzimas antioxidantes (dismutase – SOD) e ainda são agentes quelantes de catiões. A sua composição permite eliminar espécies reativas de oxigénio (ROS), desde radicais hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), radicais peróxido, aniões superóxido, óxido nítrico (NO) e ainda peróxido de hidrogénio ou inibir a sua formação [44, 45]. Apresenta também interesse económico, porque já é comercializado em produtos de cosmética e medicamentos naturais, que muitas vezes são tomados sem aconselhamento médico. O extrato GB, tal como muitos outros produtos naturais, também pode agir como pro-oxidante, por conter quercetina e procianidinas. Estes compostos quando atuam como pro-oxidantes provocam a geração de ROS e radicais fenoxilo que atacam proteínas, cadeias de DNA e lípidos de membrana celular [46]. Todas estas consequências desencadeiam uma cascata de eventos que levam à citotoxicidade e morte

celular [47]. O extrato de *G. biloba* é sem dúvida promissor devido às suas características, mas é necessário aprofundar o seu mecanismo de atuação, nas células, a longo prazo.

### 1.3.2- Extrato vegetal de *Dittrichia viscosa*



Figura 1.12 - Planta *Dittrichia viscosa* (Autor: Javier Martin)

A planta *Dittrichia viscosa* L., também conhecida como *Inula viscosa* (IV), pertence à família Asteraceae, é uma erva daninha perene, encontrada na bacia do Mediterrâneo e no nosso território português [48]. O extrato de IV tem sido usado na medicina tradicional, ao longo dos anos, pelos seus efeitos farmacológicos como atividade anti-inflamatória, antipirética, antisséptica, e no

tratamento de diabetes e distúrbios gastrointestinais. Ainda pode atuar como antifúngico e antibacteriano, consoante o tipo de extrato e da parte da planta utilizada. Estudos mostram que o extrato de IV impede a implantação do zigoto em mamíferos, causando o aborto e apresenta uma forte atividade antioxidante [49, 50]. As propriedades correspondentes ao extrato de IV devem-se a alguns dos compostos bioativos presentes em diversas partes da planta. Esses compostos são maioritariamente flavonóides e terpenóides, desde sesquiterpenos, ácidos sesquiterpenos, azulenos e lactonas, entre outros [48, 49]. Está demonstrado que existem certas substâncias presentes no extrato de IV que em concentrações elevadas provocam danos no núcleo e que, especificamente, o extrato de folhas de IV, em alguns estudos, mostrou provocar danos no DNA e morte celular e/ou apoptose [50].

Assim, o uso *Dittrichia viscosa*, como produto natural, tal como outros incluindo GB, deve ser tomado em atenção e estudado, porque conclui-se que apresenta efeitos benéficos como erva medicinal, mas quando utilizado de forma inadequada apresenta atividade citotóxica e genotóxica.

### 1.3.3– Extrato vegetal de *Melissa officinalis*



Figura 1.13 - Planta *Melissa officinalis*  
(Autor: Betty Cai)

*Melissa officinalis* L. (MO), mais conhecida como erva-cidreira, pertence à família Lamiaceae. As folhas secas são usadas tanto para fins culinários, como em forma de chás e infusões. É considerada uma das plantas mais antigas a ser usada na medicina tradicional como calmante e sedativo, digestivo e anti espasmolítico. O extrato de *M. officinalis*, principalmente da parte aérea, é usado no tratamento de febres e constipações, indigestão, tensão nervosa, hipertireoidismo, depressão, insónias leves, epilepsia, como em dores de cabeça e de dentes [51]. Encontra-se na descrição de alguns produtos farmacológicos devido ao seu grande potencial antioxidante, demonstrado por muitos autores, que mostram que os estudos fitoquímicos revelam numerosos compostos fenólicos como: ácido rosmarínico, ácido cafeico e ácido protocatecuico, flavonóides como luteolina e taninos, e ainda terpenos, desde citral (óleo essencial) e monoterpenos [52].

O ácido rosmarínico é considerado um éster e é este composto que confere os maiores benefícios da utilização de MO, no ramo da saúde. É um ácido que confere atividade anti-inflamatória, anti mutagénica, antibacteriana, antiviral e antioxidante. Está presente em muitas ervas, da família das Lamiaceae, e uma delas é a cidreira [53].

O extrato de MO é outro extrato vegetal promissor, mas que precisa de ser aprofundado, porque já vimos que muitas investigações revelam que em certas condições muitos produtos naturais atuam como citotóxicos e genotóxicos e estudos recentes apenas têm demonstrado que MO exhibe propriedades antígenotóxica e anti mutagénicas [54].

## 2– Modelos Biológicos

O uso de organismos modelo é importante para a investigação, porque são organismos com semelhanças a organismos filogeneticamente mais evoluídos, tanto a nível fisiológico, metabólico, bioquímico e biológico, no qual a comunidade científica está interessada. Assim, denomina-se organismo modelo aquele que tem sido arduamente estudado e que é fácil de manter e reproduzir em laboratório e apresenta inúmeras vantagens experimentais, desde facilidade de manipulação, rapidez de obtenção de resultados, menos dispendioso, entre outras, sendo que a principal é descobrir informações sobre outras espécies. Há três tipos de organismos modelo: 1) organismos modelo genéticos; 2) organismo modelo experimentais; e 3) organismos modelo genómicos.

Os organismos modelo genéticos são, normalmente aqueles, que têm um tempo de vida curta e se reproduzem rapidamente e em grande número. São organismos de fácil manipulação genética, sendo que têm os seus genomas totalmente sequenciados, muitos mutantes e mapas genéticos disponíveis aos investigadores. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Caenorhabditis elegans* (nemátodo), são exemplos destes organismos.

Os organismos modelo experimentais são os organismos que em termos de genética não apresentam características favoráveis ao estudo, mas em termos de desenvolvimento apresentam as melhores vantagens, por exemplo pelo seu embrião. São muito utilizados em biologia do desenvolvimento. Exemplos destes organismos são galinha (*Gallus*) e o sapo (*Xenopus*).

Os organismos modelo genómicos são seres que ocupam uma posição central na árvore evolutiva ou apresentam alguma característica ideal, no seu genoma, para se estudar, independentemente das suas vantagens ou desvantagens tanto genéticas como experimentais. É exemplo deste modelo o *Takifugu rubripes*.

De um modo geral, já existem modelos biológicos mamíferos como rato e o ratinho e os não mamíferos: *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de gemulação), *Schizosaccharomyces pombe* (levedura de fissão), *Neurospora grassa* (fungo filamentosos), *C. elegans* (nemátodo), *D. melanogaster* (mosca da fruta), *Danio rerio* (peixe-zebra), *Xenopus leavis* (sapo) e *Gallus gallus* (galinha), incluindo ainda um modelo vegetal, *Arabidopsis thaliana* [44, 55, 64].

## 2.1– Leveduras como modelo biológico

Hoje em dia, as leveduras são consideradas um dos melhores organismos modelo para análise preliminar dos efeitos biológicos de compostos e dos seus mecanismos de ação, como a sensibilidade às drogas. As leveduras são organismos bastante simples, mas que apresentam um sistema tipicamente eucariótico, partilhando muitas das características estruturais e funcionais com eucariotas superiores, o que permite estudar *in vivo*, os diferentes efeitos celulares de um composto químico. Encaixa perfeitamente em trabalhos experimentais de alto rendimento, devido a apresentar um ciclo de vida curto e um crescimento rápido em meios sólidos e líquidos. Não apresentam problemas de restrição de técnicas demasiado elaboradas ou meios muito dispendiosos. Assim, as leveduras como modelo experimental, para além de fácil manipulação, crescimento rápido, fácil manipulação genética, ainda apresentam vantagens como: controlo dos parâmetros físicos e químicos, pela possibilidade se serem cultivadas em meios definidos, disponibilidade de informação em bases de dados e elevado grau de conservação de muitos processos biológicos fundamentais. Por exemplo, um dos recursos mais vantajosos das leveduras, no estudo de sensibilidade a drogas, é a possibilidade de expressar homólogos de proteínas humanas, ou seja, existe proteínas humanas que derivam do mesmo ancestral comum que certas proteínas em leveduras, o que contribui para a descoberta de medicamentos. Esta descoberta torna-se possível pela existência de mutantes de leveduras com sensibilidade elevada ou reduzida a determinadas drogas. Outro exemplo é o facto do metabolismo de lípidos ser conservado entre eucariotas, outra prova que torna a levedura um organismo modelo para estudos de funcionalidade e homeostase lipídica [56], mas mais importante ainda, é o facto de as células de levedura terem muitos mecanismos de defesa contra stresse oxidativo (enzimas antioxidantes, captadores de ROS e fatores de transcrição (TFs) [25]. Outro aspeto igualmente importante, é o facto de as vias de sinalização de stresse genotóxico, reparação de DNA e regulação do ciclo celular, serem vias altamente conservadas entre todos os eucariotas, incluindo as leveduras [56].

### 2.1.1– *Saccharomyces cerevisiae*

Esta espécie de levedura, taxonomicamente, pertence ao domínio Eucariota, ao reino dos fungos e à família das Sacaromicetoides. É um organismo unicelular, de forma elipsoide, e muito utilizado na indústria (por exemplo, indústria panificadora e cervejeira), porque tem capacidade de resistir a condições de stresse, tem alta eficiência fermentativa, capacidade de produzir e consumir etanol, sendo um organismo osmotolerante e termotolerante [57].

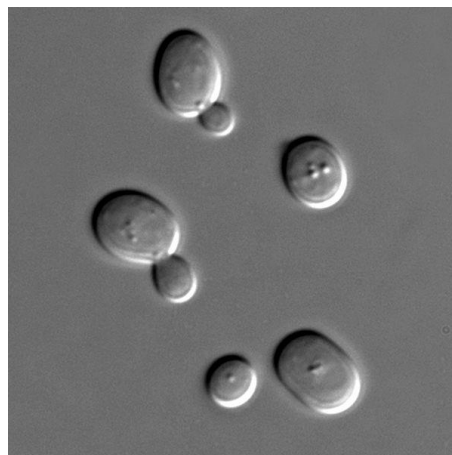


Figura 2.1 - Levedura *S. cerevisiae*  
(Autor: Masur)

*Saccharomyces cerevisiae* é considerada um modelo biológico devido a apresentar um rápido e curto ciclo celular (duplicam a cada 90-120 minutos), é de fácil manipulação genética, tendo já o seu genoma totalmente sequenciado e disponível livremente para utilização na investigação. É um organismo unicelular, morfológicamente simples, ou seja o citoesqueleto é semelhante ao encontrado em células eucarióticas superiores [58]. Também já é claro, devido à sequenciação dos genomas, que existem muitos genes que codificam proteínas, em levedura, muito semelhantes a outros seres, nomeadamente mamíferos. Assim, já foram descobertos muitos genes homólogos de humanos em leveduras [59]. Este organismo é então considerado um modelo para estudos experimentais, nas áreas de Bioquímica, Genética e Biologia Celular, relacionados com animais e plantas. É, também, usado para estudos relacionado com humanos, porque existem muitos processos fundamentais conservados (ciclo celular, certas vias metabólicas e de sinalização), em *S. cerevisiae*. Como tal, tem sido usada como modelo para estudos de envelhecimento celular, ciclo celular, metabolismo, apoptose, regulação da expressão genética, transdução de sinal, certas doenças (doenças genéticas e doenças com origem em disfunções celulares), como muitos outros processos biológicos [60]. Podem ser desenhadas comparações (protocolos e projetos experimentais) entre leveduras e humanos desde processos como metabolismo de lípidos, metabolismo mitocondrial, reparação de DNA, entre outros [61]. Existem, por exemplo, estudos que mostram que danos e defeitos na replicação do DNA, e pontos de verificação no ciclo celular de *S. cerevisiae* levam a morte celular semelhante ao processo de apoptose que ocorre em metazoários [62]. Outro estudo indica que *S. cerevisiae* apresenta um mecanismo antioxidante mediado por NO. Quando as células são expostas a stresse oxidativo com formação de ROS, o nível de arginina intracelular aumenta e, em seguida, esta arginina é convertida em NO e citrulina e diversas funções celulares

podem ser afetadas, pelo NO, por modificações pós-traducionais, como é o caso da S-nitrosação de DAPDH (enzima glicolítica), que faz com que seja translocada para o núcleo, desencadeando apoptose [25]. No entanto, a origem de NO em células de levedura ainda não é totalmente compreendido, devido à falta de ortólogos de eucariotas superiores, no genoma de levedura, embora outro estudo verificou que as células de levedura são capazes de sintetizar NO, através das mitocôndrias [63].

### 2.1.2 – *Schizosaccharomyces pombe*

Esta espécie de levedura, taxonomicamente, pertence ao domínio Eucariota, ao reino dos fungos e à família da Schizosaccharomycetaceae. É uma levedura unicelular, com uma forma de vida livre e as suas células têm forma de bastões [64]. Em estado selvagem as células desta levedura, ocorrem em populações pequenas e isoladas [65]. O seu genoma é sexto a ser totalmente sequenciado e disponível.

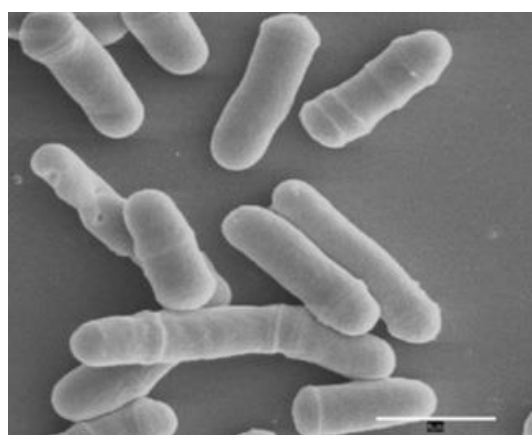


Figura 2.2 – Levedura *Sch. pombe* (Autor: David O. Morgan)

*Schizosaccharomyces pombe* é um organismo modelo usado para estudos funcionais e comparativos de processos celulares de eucariotas. Tem sido usado para estudar processos biológicos celulares, incluindo crescimento celular, divisão de ciclo celular e diferenciação mitótica, morfologia celular e citocinese, organização e manutenção do genoma, sinalização e regulação genética e ainda resposta ao stresse. É ainda outra ferramenta principal no estudo e caracterização de processos relevantes em doenças humanas [66].

Apresenta características comuns a todas as leveduras, como ciclo de vida rápido e de fácil crescimento, permite o controlo dos parâmetros físico-químicos, porque cresce em meios de cultivo definidos, tanto sólidos como líquidos. Apresenta processos biológicos conservados de eucariotas superiores, tais como mecanismos de danos e de reparação de DNA, processos bioquímicos, vias metabólicas, genes homólogos, entre outros processos, que fazem *de Sch. pombe* um organismo modelo [64].

*Schizosaccharomyces pombe* é considerada uma levedura de fissão devido ao tipo de reprodução, divergiu de *S. cerevisiae*, uma levedura que se reproduz por gemulação, e os seus genomas não mostram sintenia genética. Este aspeto apoia-se no facto de biólogos do desenvolvimento terem encontrado genes ortólogos que manifestam relações genéticas divergentes entre estes dois organismos [67]. Outra grande diferença entre estas duas leveduras, após comparações de sequências cromossómicas e pesquisa de genes conservados, é que *S. cerevisiae* revela muitos sinais de duplicações de genoma em grande escala, o que não se verifica em *Sch. pombe* [66].

Investigadores de várias áreas provaram que muitas características de *Sch. pombe* a tornam um melhor modelo de biologia de metazoários, porque possuem, por exemplo, uma via de RNA de interferência (iRNA), controlo da fase G2/M do ciclo celular, anel contrátil de citocinese e complexo de heterocromatina e ainda regulação de splicing, e tais características não se verificam na levedura de brotamento [67].

Para além destas características, existem bancos de dados que apresentam as diferentes estirpes mutantes de leveduras que nos permite avaliar, neste caso, mecanismos de proteção dos extratos vegetais, porque há estirpes mutantes de leveduras afetadas em mecanismos de regulação da resposta a danos de DNA, de reparação de DNA e resposta a stresse oxidativo.

Ambas as leveduras, no geral, são igualmente vantajosas como organismo modelo para estudos experimentais, apenas apresentam uma biologia diferente que pode favorecer um organismo para determinados estudos, principalmente que envolvem certos genes, e outro organismo para outros estudos, com referencia a diferentes genes [66]. Não descorando da levedura *S. cerevisiae* é importante salientar que a *Sch. pombe* é mais semelhante a células humanas, relativamente ao genoma, por exemplo, pelos intrões, e a sua divisão celular é simétrica, como em mamíferos (em *S. cerevisiae* é assimétrica), daí ser usada por um número considerável de grupos de investigação [68].

### **3– Objetivos deste trabalho**

O consumo de fármacos de origem química, ao longo do tempo, tem aumentado drasticamente, criando uma constante exploração de novos agentes, que possam tratar uma variedade de doenças, ou pelo menos, melhorar a qualidade de vida. No topo destas explorações encontram-se as doenças infecciosas e as doenças cancerígenas, como alvos para a conceção de medicamentos eficazes, devido à sua alta taxa de mortalidade (62). Estas abordagens, como a quimioterapia, por exemplo, apresentam limitações por serem dispendiosas e por se associarem problemas de eficiência, devido à instabilidade e efeitos secundários graves. Outro, grande, problema é a utilização descontrolada de antibióticos, que levaram a que bactérias e fungos evoluíssem vários mecanismos que os tornaram resistentes a agentes antimicrobianos antigos e novos [48]. Como tal, o grande interesse, destas explorações, foca-se em desenvolver novas estratégias que envolvem a modulação de moléculas específicas, que sejam capazes de controlar a vida ou morte celular [62]. Com a necessidade crescente de se encontrar novas terapêuticas, a comunidade científica, centrou-se na exploração de plantas medicinais, porque apresentam-se como uma das principais fontes de compostos biologicamente ativos [52]. O problema do uso destas plantas medicinais, normalmente, é devido ao desconhecimento dos seus efeitos no material genético e na saúde humana, pois existem muitos constituintes químicos isolados dos extratos vegetais que podem causar efeitos benéficos, como efeitos adversos ou têm, ainda, potencial para interagir com outros medicamentos, sem se conhecer os riscos associados [50]. Assim, a identificação de agentes antioxidantes, antimutagénicos, anticitotóxicos e antígenotóxicos presentes na natureza, nomeadamente no reino das plantas, são importantes, porque representam uma estratégia para inibir ou influenciar processos patológicos, que resultam de uma exposição a agentes prejudiciais, presentes no ambiente. Ainda, podem ser uteis como medicamentos ou como compostos a incorporar em formulações nutracêuticas e produtos de cosmética.

As atividades antioxidante, anticitotóxica e antígenotóxica têm sido atribuídas a extratos vegetais, mas os mecanismos responsáveis por estas e outras atividades reportadas estão ainda por aprofundar. Neste trabalho foi analisado o efeito de um extrato de folhas de *G. biloba* na viabilidade de células de *S. cerevisiae* e *Sch. pombe* expostas a stresse genotóxico, induzido por camptotecina e nitroprussiato de sódio. Foram utilizadas estas duas drogas, porque são substâncias químicas, usadas atualmente, como vasodilatador (nitroprussiato de sódio) e como agente anti cancro (camptotecina), que causam danos ao nível do DNA, logo torna-se importante perceber o seu mecanismo de

ação, no sentido de melhorar a sua aplicação ou substituí-las, por produtos naturais, que aumentam o seu potencial ou que proteja contra os danos que elas provocam. Pretendeu-se identificar e estudar os mecanismos de proteção de novos extratos, como *Dittrichia viscosa* e *Melissa officinalis*, com potencial atividade antígenotóxica, comparativamente ao de *Ginkgo biloba*. Além disso, a atividade antígenotóxica descrita para o extrato de *G. biloba* foi analisada em estirpes mutantes de *Sch. pombe* afetadas na resposta a reparação de danos no DNA, para tentar prever o mecanismo de ação responsável por esta atividade do extrato. Ainda se recorreu ao ensaio cometa para avaliar os danos de DNA, nos casos que se verificou atividade protetora do extrato na levedura *S. cerevisiae*.

## **4– Materiais e métodos**

### **4.1– Modelos biológicos, meios e condições de crescimento**

Nos ensaios realizados, durante o trabalho experimental, foi usado como modelo biológico *S. cerevisiae*, a estirpe laboratorial BY4741 e o modelo biológico *Sch. pombe*, a estirpe 972h<sup>-</sup>, como os seus respetivos mutantes, *rhp51*, *rad51* e *chk1*. As células

correspondentes a *Sch. pombe* e os respetivos mutantes, foram fornecidos pelos investigadores Stefania Francesconi e o Benoit Arcangioli do Institut Pasteur, Paris.

Tabela 4.1 - Resumo dos genótipos, das estirpes, dos modelos biológicos *S. cerevisiae* e *Sch. pombe*

Wt\* = estirpe selvagem

As células, de BY4741, foram cultivadas em meio YPD (meio rico para leveduras) líquido (1% p/v de extrato de levedura BD Bacto™, 2 % p/v de peptona BD Bacto™, 2% p/v

Modelo Biológico	Estirpe	Genótipo
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741	<i>Mata his3-1 leu2-0 met15-0 ura3-0</i>
<i>Sch. pombe</i>	972h <sup>-</sup>	Wt*
	<i>rhp51</i>	<i>h + rhp51 :: ura4 ura4-D18 leu1-32</i>
	<i>rad51</i>	<i>Msm10 rad51 Δ:: KanR</i>
	<i>chk1</i>	<i>h + chk1 :: ura4 leu1-32 ade6 ura4-D18</i>

de glucose), num agitador orbital a 30 °C e 200 rotações por minuto (rpm). As células de 972h<sup>-</sup> foram cultivadas em meio YD líquido (1% p/v de extrato de levedura BD Bacto™ e 2% p/v de glucose), num agitador orbital a 30 °C e 200 rpm. O crescimento das culturas foi monitorizado por medição da densidade ótica a 600 nm (DO<sub>600</sub>).

## 4.2– Extratos vegetais

### 4.2.1– Extrato etanólico de *Ginkgo biloba*

As folhas de *G. biloba* foram recolhidas, em Setembro de 2014, de um espécime existente no Campus de Gualtar, da Universidade do Minho, em Braga, Portugal. As folhas

foram secas à temperatura ambiente e, posteriormente, 6.87 g de material vegetal, foi triturado, num almofariz, e colocado em um dedal de extração de celulose (Whatman – 33mm x 100mm), dentro de um frasco, com 90 ml de etanol absoluto. O frasco foi mantido à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante uma semana. Após uma semana, evaporou-se o álcool, a pressão reduzida, através de um rotavapor (temperatura 50 °C – 70 °C e 40 - 50 rotações por minuto). Depois de todo o álcool evaporado o resíduo resultante foi congelado a - 80 °C e posteriormente foi liofilizado. Após a liofilização, o extrato de GB obtido foi dissolvido em etanol absoluto, para uma solução *stock* de 50 mg/ml. A solução foi mantida a - 20 °C e pronta para utilização.

#### **4.2.2– Extrato aquoso de *Dittrichia viscosa***

O extrato de *Dittrichia viscosa*, em forma de pó fino, foi fornecido pelo Dr. Tulay Çelik do Departamento de Biologia da Universidade Adnan Menderes, Turquia. O material vegetal foi coletado nas vizinhanças de Söke-Kuşadası/Aydın (Turquia), em Novembro de 2007. As folhas de IV foram enxaguadas com água (H<sub>2</sub>O) e secas a uma temperatura de 55 °C, em uma estufa ventilada, durante 24 horas. De seguida, as folhas foram moídas até se obter um pó fino, que foi armazenado a 4 °C [50]. O extrato, já seco, e reduzido a um pó opaco, cor de terra, foi dissolvido em água destilada, para uma solução *stock* de 50 mg/ml e posteriormente filtrado, com um filtro Whatman (nr. 4), para remover os detritos que não se dissolviam e por fim, guardou-se a -20 °C, para utilização.

#### **4.2.3– Extrato etanólico de *Melissa officinalis***

As folhas de *Melissa officinalis* foram recolhidas de espécimes cultivados em um jardim, em Santo Tirso, Portugal, em Junho de 2015. As folhas foram secas à temperatura ambiente e depois de secas, 2,172g, foram trituradas, num almofariz e colocadas em um dedal

de extração de celulose (Whatman – 25 mm x 100 mm), dentro de um frasco. Adicionou-se um volume de 75 ml de etanol absoluto, ao frasco, e foi mantido à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após uma semana, submeteu-se o extrato a uma pressão reduzida, num rotavapor (temperatura de 50 °C – 60 °C e de 40 – 50 rotações por minuto), para evaporar o etanol totalmente. De seguida, guardou-se a - 80 °C, para, posteriormente, liofilizar. Após liofilização, o produto obtido foi dissolvido no mesmo solvente de extração, para uma solução *stock* de 50 mg/ml e guardada a -20 °C.

### **4.3– Ensaios de viabilidade/suscetibilidade celular, com a estirpe BY4741**

#### **4.3.1– Suscetibilidade e viabilidade celular com tratamento de CPT e extrato de GB, IV e MO.**

Num tubo de polipropileno, inoculou-se 10 ml de meio YPD líquido, com células de BY4741, e incubou-se a 30°C, 200 rpm, durante a noite, no sentido de se obter uma cultura de células, na manhã seguinte, em fase exponencial ( $DO = 0.4$ ), medida a uma densidade ótica ( $DO$ ) de 600 nm. Após recolher as células, em fase exponencial, realizou-se uma diluição seriada até  $10^{-4}$  e espalhou-se, em placas com meio YPD sólido (1% p/v de extrato de levedura BD Bacto™, 2 % p/v de peptona BD Bacto™, 2% p/v de glucose e 2% p/v de agar), contendo 20  $\mu$ M de CPT (dissolvido em NaOH a 0.1M), e 2 mg/ml de extrato de GB, IV e MO, respetivamente, com gotas de 5  $\mu$ l. Por fim, colocou-se na estufa a 30 °C, durante 48h. Posteriormente as placas foram observadas e fotografadas.

Um outro ensaio foi realizado, em que se inoculou meio YPD líquido, com BY4741 e incubou-se a 30 °C, 200 rpm, durante a noite, para de manhã se obter uma cultura  $DO_{600} = 0.4$  (fase exponencial). Recolheu-se 20  $\mu$ l de cultura e fez-se uma contagem de células, com recurso a uma câmara de Neubauer, para se obter uma suspensão com  $10^5$  células/ml. Adicionou-se a suspensão celular a 3 ml de uma solução de agar (2% p/v), a uma temperatura entre os 50 °C-55 °C, e espalhou-se em placas de meio YPD com GB (5% e 10%) incorporado. Deixou-se solidificar e de seguida colocou-se discos de papel de filtro, onde, posteriormente se colocou os respetivos tratamentos (15  $\mu$ l de CPT). Colocou-se na estufa a 30 °C, durante dois dias. Posteriormente as placas foram observadas e fotografadas.

### **4.3.2 – Viabilidade celular com tratamento de SNP e extrato de GB, IV e MO**

O ensaio de viabilidade realizado foi igual ao ensaio descrito, primeiramente, para CPT, só que neste caso, usou-se 300 mM de SNP (dissolvido em água desionizada) e diferentes concentrações de extrato de GB, IV e MO, a 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml e 750 µg/ml. Todo o manuseamento com SNP é feito ao abrigo da luz, porque é muito instável e quebra-se facilmente, originando cianeto, que é bastante tóxico para as células.

Em outro ensaio, preparou-se um inoculo em meio YPD líquido, que se colocou a incubar a 30 °C com uma agitação de 200 rpm, durante a noite para obter as células a uma  $DO_{600}=0.05 - 0.08$ , de manhã. Recolheu-se a cultura de células e distribuiu-se, por tubos de polipropileno, um volume de 7 ml e adicionou-se os respetivos tratamentos, ou seja, SNP a 50 mM, 100 mM e 200 mM e extrato de GB a 5%. Colocou-se as células a incubar a 30 °C, 200 rpm, durante 6 horas, em que a cada hora e meia se recolhia uma amostra, diluía-se seriadamente até  $10^{-4}$  e espalhava-se, 100 µl de suspensão celular, em placas de meio YPD sólido. Por fim, deixava-se as placas a incubar, a uma temperatura de 30 °C, para posterior contagem de unidades formadoras de colónias (CFU's).

## **4.4– Ensaio de viabilidade celular, com a estirpe 972h<sup>-</sup>**

### **4.4.1– Viabilidade celular com tratamento de CPT e extrato de GB, IV e MO**

Cerca de 10 ml de meio YP líquido, foi inoculado com células de 972h<sup>-</sup>, e incubou-se a 30 °C, 200 rpm, durante a noite, no sentido de se obter uma cultura de células, na manhã seguinte, em fase exponencial ( $DO= 0.4$ ), medida a uma densidade ótica (DO) de 600 nm. Recolheu-se a cultura, em fase exponencial, e realizou-se uma diluição seriada até  $10^{-4}$ . De seguida, espalhou-se, por gotas de 5 µl, as suspensões celulares tratadas, em placas de meio YD sólido, com incorporação de 20 µM de CPT e de 2 mg/ml de extrato vegetal de GB, IV e MO, respetivamente. Incubou-se, numa estufa a 30 °C, durante três dias. Posteriormente, as placas foram observadas e fotografadas.

Em outro ensaio foi testada a viabilidade celular, descrita previamente, com células da estirpe selvagem 972h<sup>-</sup> e os respetivos mutantes, afetados em processos de reparação do DNA, *rhp51*, *rad51* e *chk1*. Utilizou-se CPT a 20 µM e os extratos GB, IV e MO a uma concentração de 1 mg/ml. Os mutantes *rad51* e *rhp51* são afetados num mesmo gene que codifica uma proteína que tem funções importantes, principalmente, na reparação de quebras de cadeia dupla do DNA, através de recombinação homóloga, porque desempenha o ponto fulcral do processo, ou seja, *Rad51* é importante na pesquisa de homologia e emparelhamento de falhas no DNA [69]. O mutante *rhp51* é proto-autotrófico, isto é, não tem nenhuma incapacidade de sintetizar moléculas essenciais para a construção de biomoléculas, enquanto que *rad51* é auxotrófico, ou seja, é incapaz de sintetizar uracilo e leucina [70]. As duas marcas genéticas que *rhp51* apresenta no *ura4* e *leu1* (Tabela 4.1), não afeta a sua função, por isso estes dois mutantes devem comportar-se de igual modo. Entram em outros processos biológicos, desde replicação e recombinação de DNA, divisão nuclear meiótica e organização dos telómeros [69]. O mutante *chk1* está afetado no gene que codifica para proteína *Chk1*, uma cinase de ponto de verificação, envolvidas no controlo de ciclo celular e que são maioritariamente ativadas em resposta a lesões genotóxicas [71], sendo restritas à fase S, onde controlam o progresso de replicação, e na fase G2/M, do ciclo celular. *Chk1* é regulada por fosforilação, pela via ATM [72]. A ativação de *chk1* resulta na iniciação do ponto de verificação do ciclo celular, reparação do DNA e morte celular para prevenir que as células danificadas progridam no ciclo celular. Especificamente, em *Sch. pombe*, danos no DNA induzem a paragem das células na fase G2, através de *Chk1* [73].

#### **4.4.2– Viabilidade celular com tratamento de SNP e extratos de GB, IV e MO**

Um ensaio de viabilidade, previamente descrito, foi realizado com SNP a uma concentração de 300 mM e diferentes concentrações de extrato: GB a 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml e 750 µg/ml; IV a 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml e 750 µg/ml; MO a 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml.

Em outro ensaio aplicou-se o mesmo método de viabilidade, mas com células da estirpe selvagem 972h<sup>-</sup> e os respetivos mutantes de reparação de danos no DNA, *rhp51*, *rad51* e *chk1*. Utilizou-se SNP a uma concentração de 300 mM e extrato de GB 5%.

#### 4.5– Ensaio cometa, com BY4741

De 1 ml de células, colheu-se para um microtubo, de uma cultura, em fase exponencial ( $DO_{600}=0.4$ ), em meio YPD líquido, de BY4741. Centrifugou-se durante 2 min, a 14100 rpm, numa microcentrifuga. De seguida, rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de água desionizada ( $dH_2O$ ), para lavar as células e repetiu-se o procedimento de lavagem, mais uma vez. Posteriormente, adicionou-se 1ml de tampão de liticase (200 U/ml de liticase, 400  $\mu$ l de água ultra pura ( $upH_2O$ ), 500  $\mu$ l de tampão S2X (sorbitol 2 M e  $KH_2PO_4$  0.05 M, a  $pH=6.5$ ) e 50 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol) e incubou-se durante 40 min, 30 °C, 200 rpm. Após os 40 min em tampão de liticase, centrifugou-se mais 2 min, nas mesmas condições e fez-se duas lavagens com tampão S e ressuspendeu-se o pellet em 1 ml do mesmo tampão. Da suspensão de células, distribuiu-se por diferentes microtubos para se realizar os respetivos tratamentos, para um volume final de 100  $\mu$ l. Nos tratamentos, usou-se extrato de GB a uma concentração de 0.5%, 2% e 5%, CPT a 50  $\mu$ M e SNP a 200 mM. Depois de se aplicar os tratamentos respetivos às células, incubou-se a uma temperatura de 30 °C, 200 rpm. Após 20 minutos de incubação, fez-se mais uma lavagem com tampão S e guardou-se o pellet, no gelo até nova utilização. No passo seguinte, ressuspendeu-se o pellet em 20  $\mu$ l de low melting agarose (LMA; 1,5 % em tampão S) e espalhou-se em lâminas, previamente revestidas com normal melting agarose (NMA; 1 % p/v em água desionizada) e colocou-se no gelo, cerca de 5 minutos, até se remover as lamelas. As lâminas foram submersas, durante 20 min., em tampão de lise (NaOH 30 mM, NaCl 1 M, EDTA 50 mM, Tris HCl 10 mM e laurissarcosina 0.05% w/v, a um  $pH=10$ ). Depois do tampão de lise, as lâminas passaram para tampão de eletroforese (NaOH a 30 mM, EDTA a 10 mM e Tris HCl a 10 mM) a um  $pH=10$ , durante 20 min. Logo após os 20 min. em tampão de eletroforese, correu-se a eletroforese (0,7 V/cm), durante 10 minutos. De seguida, transferiu-se as lâminas para tampão de neutralização (Tris HCl 0.1 M;  $pH=7.4$ ), durante 10 min e mais 10 min em etanol a 96% e colocou-se as lâminas a secar. Após estarem totalmente secas, as células eram coradas com um marcador de DNA fluorescente, GelRed e observadas ao microscópio de fluorescência (ampliação de 400x).

No sentido de mostrar que estávamos a trabalhar, no ensaio cometa, com células viáveis, ou seja, que as concentrações de substâncias químicas usadas nos tratamentos não matava as células, visto que queríamos ver os danos no DNA, realizou-se um outro ensaio de

viabilidade, nas mesmas condições utilizadas no ensaio cometa. Assim, aplicou-se às células CPT a diferentes concentrações, 5  $\mu$ M, 15  $\mu$ M e 50  $\mu$ M, e SNP a 50 mM, 100 mM e 200 mM.

#### **4.6 - Análise estatística**

Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados são apresentados como média  $\pm$ desvio padrão (DP). Foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) e o teste de Turkey para as comparações, através do *software Graph Pad Prism v5* (Graph Pad software, Inc, La Jolla, CA, USA). Todos os \* representam diferenças estatisticamente significativas, quando comparado ao respetivo controlo, ou seja, \* significa  $p < 0.05$ , \*\* significa  $p < 0.01$  e \*\*\* significa  $p < 0.001$ .

## **5 – Resultados, com o modelo biológico *S. cerevisiae***

### **5.1- Efeitos de extratos vegetais, GB, IV e MO sobre a viabilidade celular sob condições de stresse genotóxico, provocado pelo CPT**

Para se estudar a reação de células da levedura *S. cerevisiae*, da estirpe selvagem BY4741, sob condições de stresse provocado pela substância química CPT e o comportamento juntamente com substâncias naturais, como os extratos de GB, IV e MO, realizaram-se dois ensaios diferentes.

Num dos ensaios as células foram espalhadas em placas de meio YPD sólido, onde se encontravam incorporados, no meio, o extrato de GB a 5% ou 10% (p/v). O CPT era aplicado, diretamente, nos discos de papel de filtro, onde as células se encontravam, permanentemente, em contacto com as diferentes substâncias. Da análise dos resultados, verificou-se que CPT exerce um efeito inibitório de crescimento celular, devido aos halos de inibição observados nas placas de controlo, onde há ausência de extrato de GB, ou seja, os halos de inibição indicam-nos ausência de crescimento celular e que as células, de BY4741, são suscetíveis ao CPT (Figura 5.1 A e 5.1C). Em relação ao extrato de GB, tanto a 5% como a 10%, não se verificou qualquer tipo de efeito sobre as células (expostas a CPT), porque os halos de inibição, observados nas placas que continham GB incorporado, são semelhantes aos respetivos controlo (Figura 5.1 B e 5.1D).

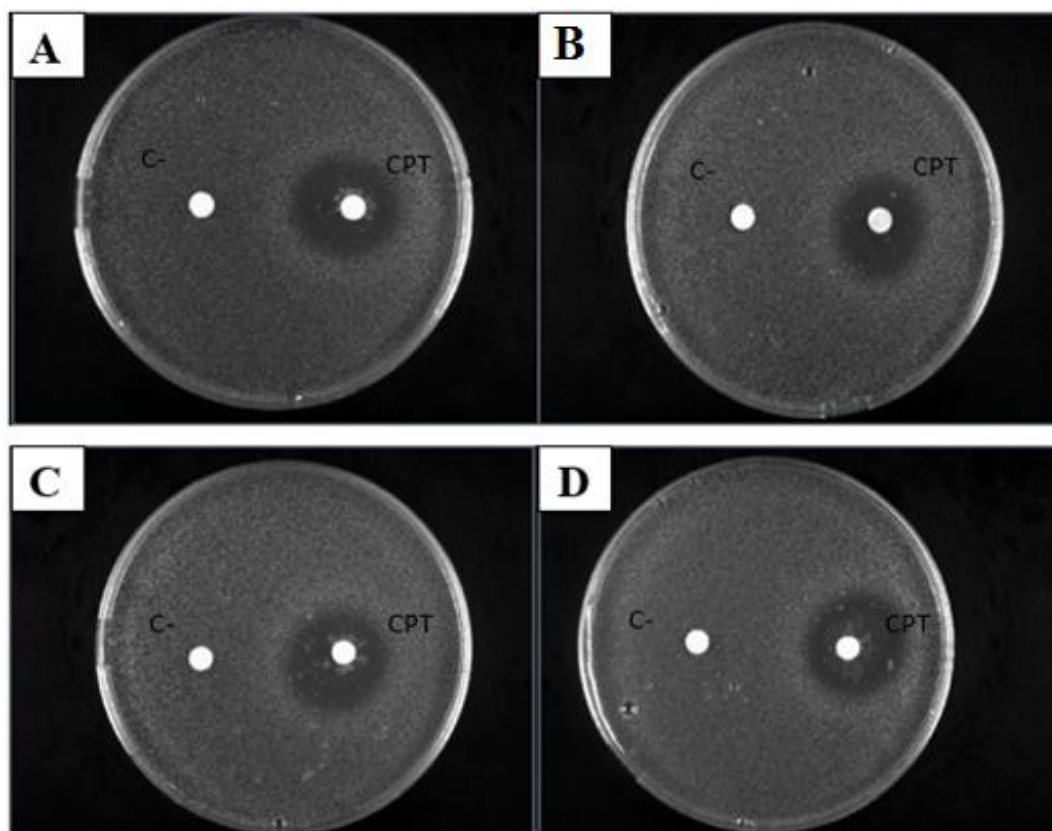


Figura 5.1- **As células de *S. cerevisiae*, da estirpe BY4741, são suscetíveis ao CPT.** As células foram espalhadas, em placas com meio YPD sólido (A e C), e em placas de meio YPD sólido, com incorporação de extrato de GB a 5% e a 10% (B e D, respetivamente). Foram colocados discos de papel de filtro onde se adicionou 20µl CPT. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 h, ao fim das quais os halos de inibição foram observados e fotografados com o software ChemiDoc™XRS. Os resultados da figura correspondem a uma experiência representativa de três experiências independentes.

Outro dos ensaios realizados, consistiu no mesmo propósito do anterior, mas com mais dois extratos vegetais diferentes, extrato de *Dittrichia viscosa* e extrato de *Melissa officinalis*, mas que pela literatura apresentam o mesmo potencial de bioatividades que o extrato de GB. Neste ensaio, as células foram colocadas, após uma diluição seriada até  $10^{-4}$ , em placas de meio YPD sólido, que continham 20 µM CPT e 2 mg/ml de extrato vegetal de GB, IV e MO, cada um, a fim de se observar proteção, após 48 horas de incubação, a 30 °C (Figura 5.2).

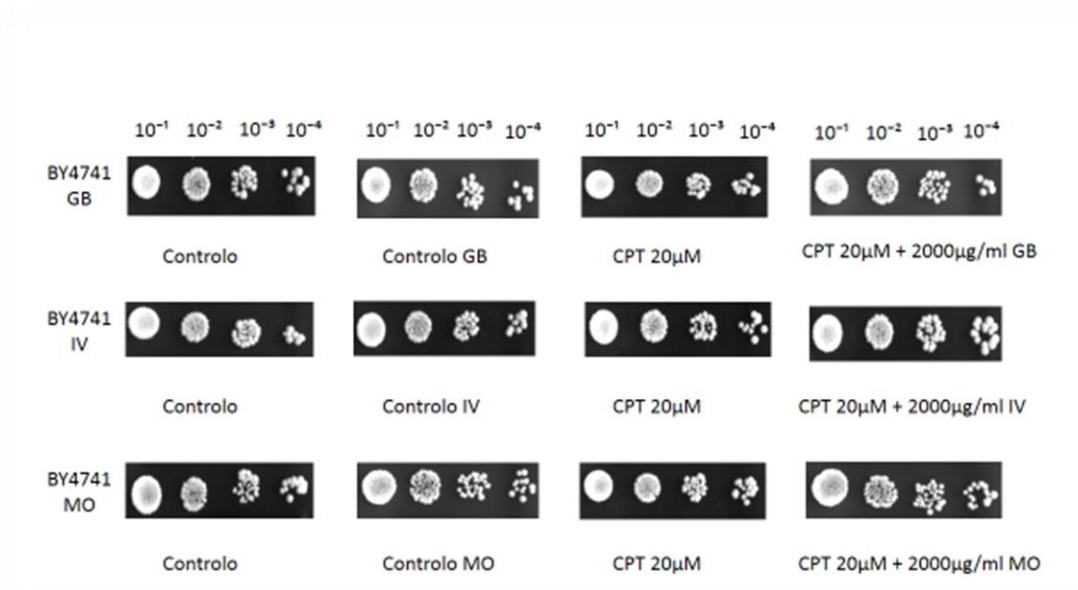


Figura 5.2 - Viabilidade celular na presença de CPT e de CPT com extratos de GB, IV ou MO, de *S. cerevisiae*, da estirpe selvagem BY4741. As células foram diluídas seriadamente até  $10^{-4}$  e 5  $\mu$ l de cada diluição foi colocado em placas com meio YPD sólido, com incorporação de 20 $\mu$ M CPT e 2 mg/ml de extratos, GB, IV e MO, respetivamente. As placas foram incubadas a 30°C, durante 48 h, ao fim das quais as colónias foram observadas e fotografadas com o software ChemiDoc™XRS. Os resultados da figura correspondem a uma experiência representativa de três experiências independentes.

Os resultados obtidos indicam-nos que as células de *S. cerevisiae* quando em contacto com CPT e os extratos de GB, IV e MO têm a mesma viabilidade celular, como é possível verificar na figura 5.2. No entanto, os resultados anteriores, respetivos ao ensaio dos discos, mostraram que CPT inibe a proliferação celular, porque a concentração de CPT junto aos discos é mais elevada que no caso da incorporação de CPT no meio de cultura (Figura 5.1 e 5.2), apesar de nos dois ensaios as células estarem permanentemente em contacto com a droga. Relativamente aos três extratos, não se verificou qualquer efeito sobre a viabilidade celular, quando comparadas as placas que continham CPT mais o respetivo extrato e as placas controlo (Figura 5.2).

## 5.2- Efeitos de extratos vegetais, GB, IV e MO sobre a viabilidade das células sob condições de stresse genotóxico, provocado pelo SNP

Outra substância química, o SNP, foi estudada. SNP está descrito como uma fonte de NO, que apresenta funções importantes no organismo, desde proteção contra infecções, atua como neurotransmissor, é considerado um sinalizador intra e intercelular, entre muitas outras funções, mas quando as suas concentrações excedem a capacidade que as células têm de o processar, pode provocar efeitos nefastos, porque o NO pode reagir rapidamente com o O<sub>2</sub> e interagir com outros radicais e formar produtos prejudiciais às células, como produtos nitrogenados que provocam efeitos como stresse genotóxico e possível morte celular. Ao estudo, adicionou-se substâncias naturais, como extrato de GB, IV e MO para se investigar o efeito proteção das células, expostas ao efeito nocivo, causado pelo SNP. Para tal, realizou-se uma experiência de viabilidade celular.

Em todos os casos, as células foram tratadas previamente com 300 mM SNP e diferentes concentrações de extrato de GB, IV e MO (100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml e 750 µg/ml). As culturas foram incubadas a 30 °C, 200 rpm, durante 90 min. Ao longo dos 90 min, foram colhidas alíquotas, em diferentes pontos de tempo (de 30 em 30 minutos), diluiu-se (10<sup>-4</sup> diluição) e espalhou-se, em meio YPD sólido a fim de observar a viabilidade celular, dada pelo crescimento ou ausência de crescimento de colónias, ao longo do tempo, quando comparadas com as placas de referência. Foram consideradas placas de referências aquelas que não levavam qualquer substância tóxica, como controlo negativo e controlo com o extrato vegetal, em questão. A que levava apenas a substância tóxica, SNP, foi considerada como controlo positivo.

Da análise dos resultados, verificou-se que o SNP, ao longo de 90 min, a uma concentração elevada não provoca perda de viabilidade celular, em cultura de células de *S. cerevisiae*, como se pode observar nas placas de controlo positivo (Figura 5.3). Em relação ao efeito dos extratos vegetais, verifica-se que os três extratos também não provocam perda de viabilidade celular, como se observa nas placas que apenas contêm GB, IV e MO. Um dos objetivos era observar o comportamento dos extratos quando adicionados a suspensões celulares em contacto com o SNP e da análise dos resultados verificou-se que GB e IV não provocam nenhum efeito (Figura 5.3A e 5.3B). Apesar que, no ensaio onde se testou o efeito

do extrato vegetal MO, observa-se que o SNP não provoca perda de viabilidade celular, nem o extrato vegetal, mas o SNP juntamente com o extrato mostra uma ligeira perda de viabilidade celular, pois apresenta menos crescimento de colónias, em todas as concentrações testadas (Figura 5.3C), o que sugere que o extrato de MO tem um efeito conjunto com o SNP ao afetar a viabilidade celular.

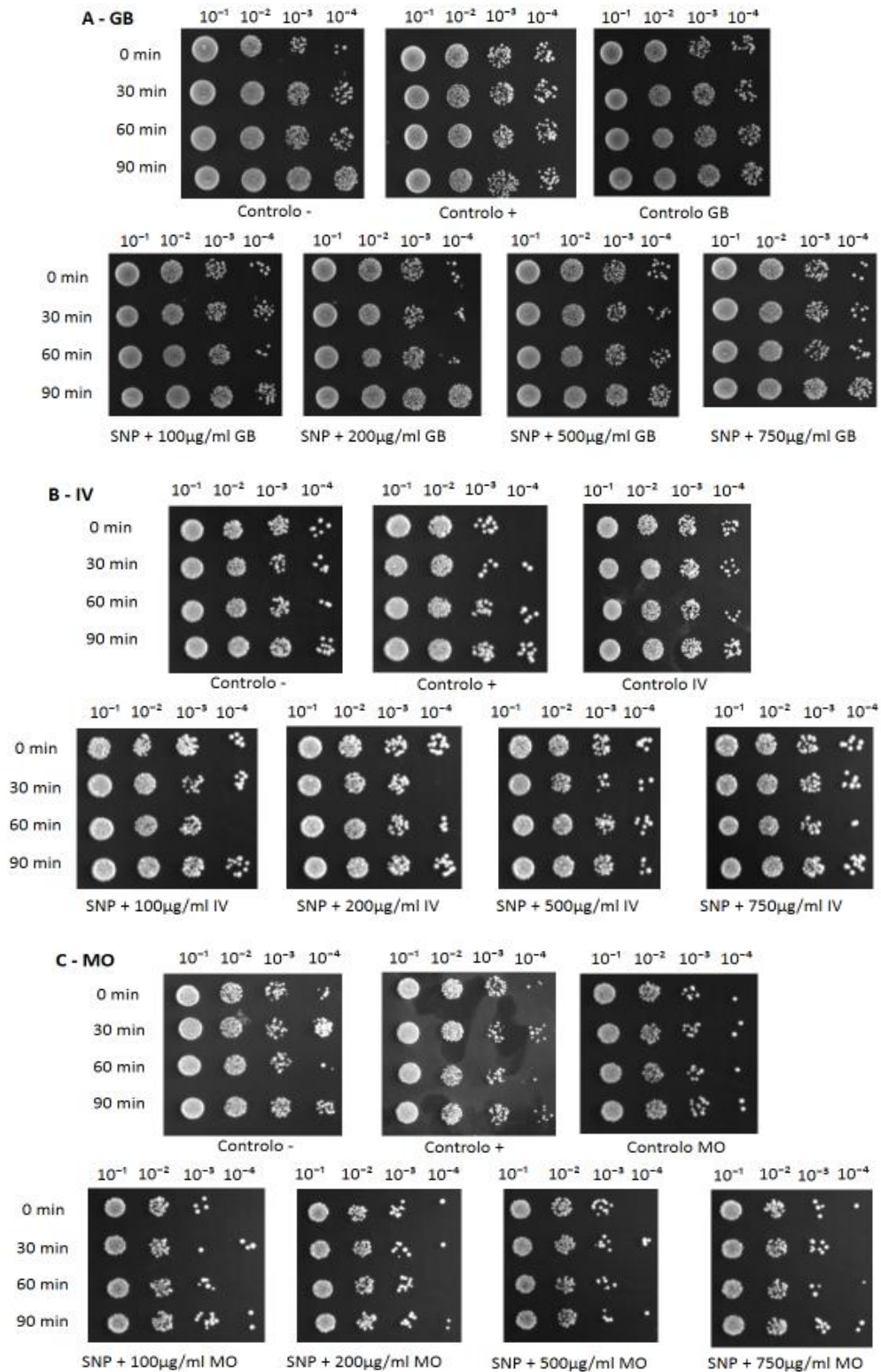


Figura 5.3 - Viabilidade celular na presença de SNP e de SNP com extratos de GB, IV ou MO, de *S. cerevisiae*, da estirpe selvagem BY4741. As células foram incubadas com 300 mM de SNP e com extrato de GB, IV e MO a diferentes concentrações: 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml e 750 µg/ml (A, B e C, respectivamente). A cada tempo de colheita (0min, 30min, 60min e 90min) uma alíquota de 100µL foi colhida, diluída serialmente até  $10^{-4}$  e 5µL de cada diluição colocados em meio YPD sólido. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 h, ao fim das quais as colónias foram observadas e fotografadas com o software ChemiDoc™XRS. Os resultados da figura correspondem a uma experiência representativa de três experiências independentes.

Após se prolongar o tempo de exposição das células aos tratamentos (cerca de 7,5 horas, no total), neste caso SNP a diferentes concentrações: 50 mM, 100 mM e 200 mM e extrato de GB5%, verificou-se que o SNP há medida que aumenta a concentração e por volta das três horas (T2) verifica-se um decréscimo no número de CFU's, relativamente ao controlo, o que nos indica perda de viabilidade celular. Relativamente ao extrato de GB, observou-se que não provoca efeito nas células, como se confirma pelo controlo GB, mas GB quando adicionado com SNP, há medida que aumenta a concentração, principalmente na maior concentração de SNP (200 mM de SNP + GB5%), por volta de T1-T2, verifica-se decréscimo do número de CFU's, relativamente aos controlos e aos que apenas são tratados com SNP, o que nos indica perda de viabilidade celular. Assim, podemos concluir que o SNP, em contacto com as células, por um período de tempo mais prolongado, afeta a sua viabilidade celular e que o GB parece apresentar um efeito sinérgico, porque parece potenciar o efeito do SNP na viabilidade celular, dependente da dose, mas não é significativo. (Figura 5.4).

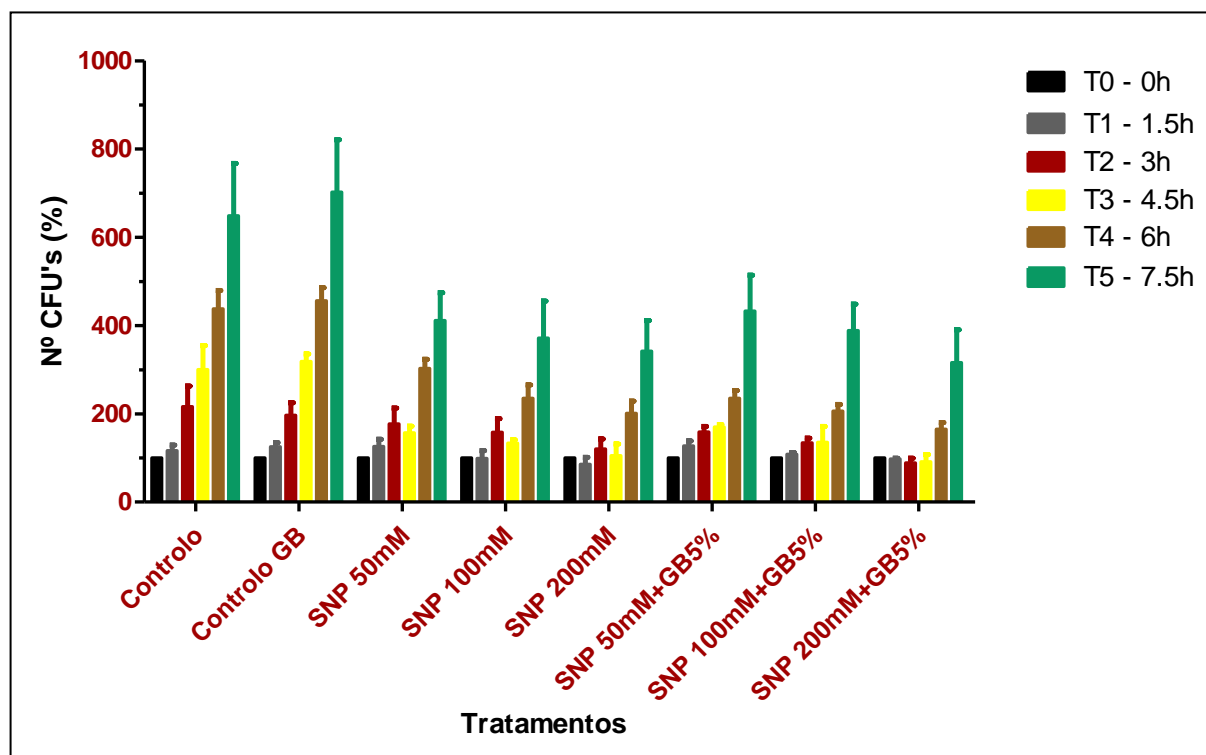


Figura 5.4 - Viabilidade celular na presença de SNP e de SNP com extrato de GB, de *S. cerevisiae*, da estirpe selvagem BY4741. As células foram incubadas com diferentes concentrações de SNP: 50 mM, 100 mM e 200 mM e com extrato de GB5%. A cada tempo de colheita (T0= 0h, T1= 1.5h, T2= 3h, T4= 4.5h e T5= 6h) uma alíquota de 100 µl foi colhida, diluída serialmente até  $10^{-4}$  e 100µL da última diluição foram espalhados em meio YPD sólido. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 h, ao fim das quais as colónias foram contadas. Os resultados da figura correspondem a uma experiência representativa de três experiências independentes.

### 5.3 – Extrato de GB protege as células de danos do DNA, provocados por CPT e SNP

Pelas propriedades e características que os extratos vegetais apresentam decidimos testar o efeito antígenotóxico, do extrato de GB, que pela literatura possui inúmeras atividades, como atividade antioxidante, capacidade de eliminar radicais livres e prevenir apoptose, atividade contra o envelhecimento e atividade antígenotóxica [75]. A atividade antígenotóxica foi realizada através do ensaio cometa, em células de levedura de *S. cerevisiae*, da estirpe laboratorial BY4741.

Neste ensaio, após digerir a parede celular e obter-se os esferoplastos, tratou-se as células com uma concentração de 50  $\mu$ M de CPT e 200 mM de SNP, e diferentes concentrações de extrato de GB, 0.5%, 2% e 10%. Todo o manuseamento, do ensaio, com os esferoplastos, foi em tampão S para manter a isotonicidade, visto que estão mais suscetíveis por não apresentarem parede celular. Na experiência, incluiu-se diferentes controlos: um controlo com células sem tratamento absolutamente nenhum, controlo negativo, com os solventes das substâncias que usamos, ou seja, o controlo negativo de CPT que continha etanol e NaOH 0,1 M (solventes do extrato e CPT, respetivamente) e o controlo negativo de SNP que continha etanol e água desionizada. Estes controlos são referentes às substâncias que não causam danos no DNA. Introduziu-se, ainda, controlos positivos, em que as culturas eram expostas apenas ao CPT ou ao SNP. Tudo para observarmos e compararmos como as células se comportam, consoante as substâncias a que estão expostas, nas mesmas condições.

Da análise dos resultados obtidos, após a realização do ensaio cometa, verifica-se que tanto CPT como SNP são drogas que causam bastantes danos ao nível do DNA, onde se observa pelo comprimento das caudas dos cometas, correspondentes aos controlos positivos, quando comparados com os controlos que não têm substâncias genotóxicas. (Figura 5.5A e 5.5C)

Quando as células são tratadas com o extrato de GB verifica-se uma diminuição das caudas dos cometas, ou seja, os danos no DNA, causados pelo CPT e pelo SNP, não são tão grandes. À medida que aumenta a concentração de extrato de GB, nos dois casos, verifica-se uma diminuição das caudas dos cometas significativa, quando comparada com o controlo positivo. Assim, denota-se que o extrato de GB apresenta atividade antígenotóxica, isto é, protege o DNA de danos provocados pelas substâncias tóxicas (CPT e SNP). No ensaio com o

CPT verifica-se uma ação antigenotóxica, estatisticamente significativa, a partir da concertação de 2% de extrato de GB (Figura 5.5A), enquanto no ensaio com o SNP observa-se já na menor concentração de extrato (GB 0.5%) (Figura 5.5C).

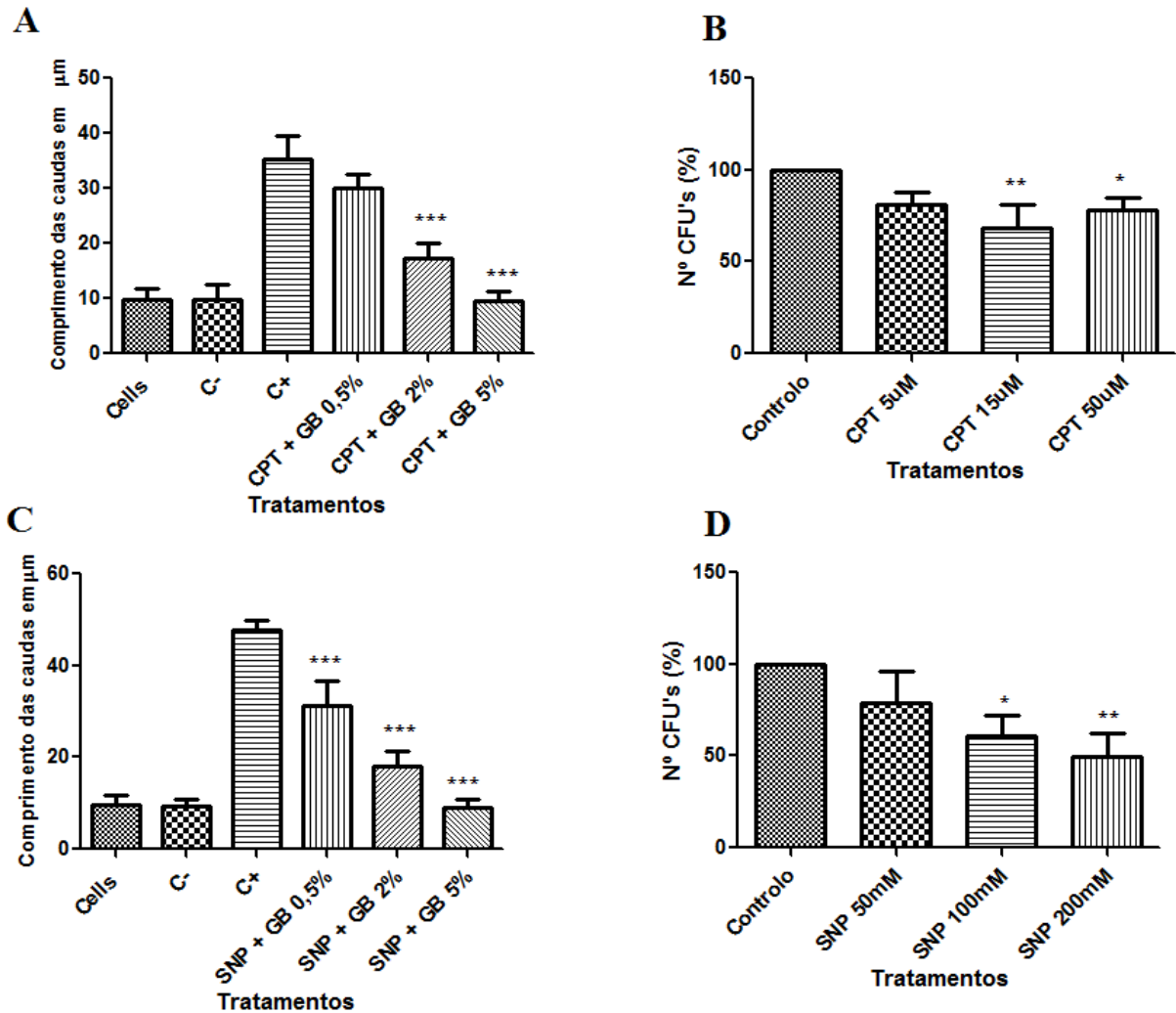


Figura 5.5 - O tratamento de células *S. cerevisiae*, BY4741, com GB protege o DNA contra danos genotóxicos causados por CPT e SNP. Os esferoplastos foram incubados com 50  $\mu\text{M}$  de CPT e extrato de GB (0.5%, 2% e 10%) (figura A) e com 200 mM de SNP e extrato de GB (0.5%, 2% e 10%) (figura A) e com 200 mM de SNP e extrato de GB (0.5%, 2% e 10%) (figura C), durante 20 min. Os danos no DNA foram analisados através do ensaio cometa (ver Materiais e Métodos). As células sem qualquer tratamento foram incluídas na experiência (células não tratadas - Cells), bem como as células tratadas com etanol e NaOH (solventes de GB e CPT), que correspondem ao C<sup>-</sup> e tratadas apenas com CPT (C<sup>+</sup>). Os valores são a média  $\pm$  DP de três experiências independentes (\* representa  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ). As células de BY4741 foram incubadas com CPT (5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ) (figura B) e com SNP (50 mM, 100 mM e 200 mM), e foram incubadas nas mesmas condições usadas no ensaio cometa ( $T^\circ=30^\circ\text{C}$ , 200 rpm, durante 20min). Uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  foi colhida, de cada tratamento e diluída serialmente até  $10^{-4}$ . 100  $\mu\text{l}$  da última diluição foi espalhada em meio YPD sólido. As placas foram incubadas a  $30^\circ\text{C}$  durante 48 h, ao fim das quais as colónias foram observadas e contadas. Os resultados são média  $\pm$  DP e correspondem a uma experiência representativa de três experiências independentes.

Como o CPT e SNP são substâncias que apresentam atividade genotóxica e subsequentemente podem levar à morte celular, realizou-se um ensaio de viabilidade celular com diferentes concentrações de CPT (5  $\mu$ M, 15  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) e de SNP (50 mM, 100 mM e 200 mM) para mostrar que estávamos a trabalhar com concentrações em que as células eram viáveis. Incluiu-se um controlo negativo, apenas com os solventes das diferentes drogas, para termos um termo de comparação. A morte celular foi considerada como perda de viabilidade celular expressa como percentagem de unidades formadoras de colónias, quando comparada com a placa de referência, sem qualquer tratamento tóxico (controlo negativo).

Dos resultados obtidos, verificou-se que, embora, CPT e SNP tenham provocado diminuição de viabilidade celular, as diferenças não foram estatisticamente significativas, em relação ao controlo, sem tratamento (Figura 5.5B e 5.5D). Assim, concluiu-se que nas condições do ensaio cometa as células eram viáveis.

## **6 – Resultados, com o modelo biológico *Sch. pombe***

### **6.1- Efeitos de extratos vegetais, GB, IV e MO sobre a viabilidade das células sob condições de stresse genotóxico, provocado pelo CPT**

Foi utilizado outro modelo biológico, a estirpe selvagem 972h<sup>-</sup>, da levedura *Sch. pombe* sob condições de stresse provocado pela substância química CPT e o comportamento juntamente com substâncias naturais, como os extratos de GB, IV e MO.

A utilização de *Sch. pombe* deveu-se ao facto de em observações pessoais, experiencias preliminares apontaram para que este modelo fosse mais suscetível aos efeitos provocados pelas drogas estudadas, CPT e SNP, como para os efeitos provocados pelos extratos vegetais, o que nos permitiu complementar os nossos objetivos.

Assim, realizou-se um ensaio em que as células foram colocadas, após uma diluição seriada até 10<sup>-4</sup>, em placas de meio YP sólido, que continham CPT a uma concentração de 20  $\mu$ M e extrato vegetal de GB, IV ou MO a uma concentração elevada de 2000  $\mu$ g/ml, respetivamente, a fim de se observar a perda de viabilidade celular ou proteção, após 72 horas de incubação, a 30 °C (temperatura ideal de crescimento). Considerou-se perda de viabilidade celular, quando não se observava crescimento de colónias, na placa, quando comparado com

as placas de referência, ou seja, as placas sem qualquer tratamento tóxico (controlo negativo) e com a placa que continha apenas CPT (controlo positivo).

Dos resultados obtidos, verificou-se que há perda de viabilidade celular, das células de *Sch. pombe*, em contacto com o CPT. Observou-se também, que quando as células são tratadas com o extrato vegetal GB e IV juntamente com o agente tóxico, há diminuição de viabilidade celular, mas essa diminuição é muito menor do que quando as células são tratadas apenas com CPT. Assim, verifica-se que GB e IV têm um poder de proteção. Já o extrato de MO não apresenta a mesma proteção, porque da observação dos resultados houve ausência de crescimento celular tanto no tratamento com a droga como quando as células são tratadas com o extrato (Figura 6.1).

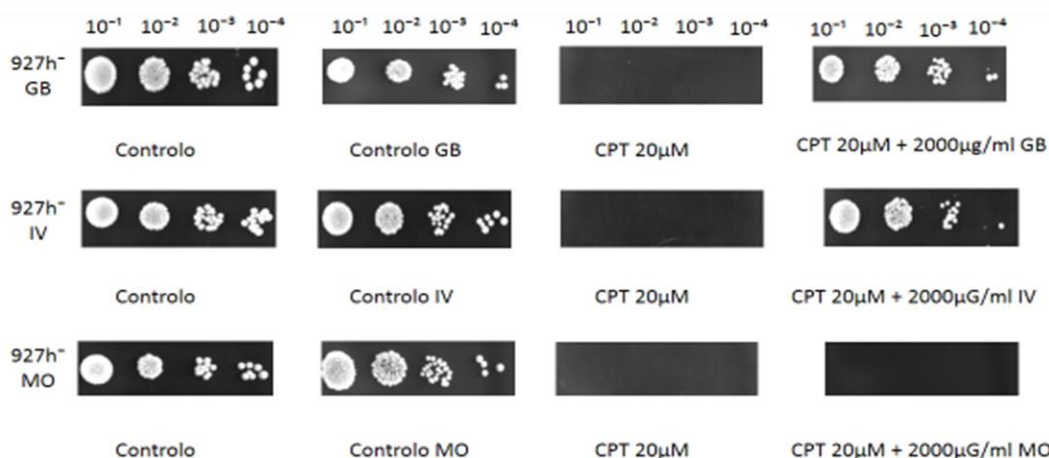


Figura 6.1 - Viabilidade celular na presença de CPT e de CPT com extratos de GB, IV ou MO, de *Sch. pombe*, da estirpe 927h<sup>-</sup>. As células foram diluídas seriadamente até 10<sup>-4</sup> e 5 µl de cada diluição foi colocado em placas com meio YP sólido, com incorporação de 20 µM CPT e os diferentes extratos, GB, IV e MO a uma concentração de 2000 µg/ml, respetivamente, e os diferentes extratos, GB, IV e MO a uma concentração de 2 mg/ml, respetivamente. As placas foram incubadas a 30°C durante 72 h, ao fim das quais as colónias foram observadas e fotografadas com o *software ChemiDoc™XRS*. Os resultados da figura correspondem a uma experiência representativa de três experiências independentes.

Pelos resultados que se obtiveram no ensaio anterior e pelas características do CPT, que é uma substância que causa quebras de cadeia dupla no DNA, que são reparadas essencialmente por recombinação homóloga, decidiu-se testar o efeito protetor de GB e IV, que mostraram ter potencial como agentes naturais protetores contra CPT, por indução da capacidade de reparação de DSB's. Assim, realizou-se outro ensaio em que incluímos, para além da estirpe selvagem 927h<sup>-</sup> (como um termo de comparação), os mutantes afetados na recombinação homóloga, desta mesma estirpe. Os mutantes utilizados foram o *rhp51*, *rad51* e *chk1*.

O mesmo procedimento foi realizado, onde as células, das diferentes culturas, foram colocadas, após uma diluição seriada até  $10^{-4}$ , em placas de meio YD sólido, que continham CPT a uma concentração de  $20 \mu\text{M}$  e extrato vegetal de GB ou IV a uma concentração de  $1000 \mu\text{g/ml}$ , respetivamente, a fim de se observar a perda de viabilidade celular ou proteção, após 72 horas de incubação, a  $30^\circ\text{C}$ . Considerou-se perda de viabilidade celular, quando não se observava crescimento de colónias, na placa, quando comparado com as placas de referência, ou seja, as placas sem qualquer tratamento tóxico (controlo negativo) e com a placa que continha apenas CPT (controlo positivo). Não foi testado o extrato de MO por não ter apresentado resultados promissores.

Dos resultados obtidos, verificou-se que tanto a estirpe  $972\text{h}^-$  como os respetivos mutantes quando em contacto com o CPT perdem viabilidade celular (Figura 6.2). Mas tanto o extrato de GB como o extrato de IV, quando adicionados às células, apresentam menor diminuição de viabilidade celular na estirpe selvagem  $972\text{h}^-$ , como tínhamos observado, e do mutante  $chk1$ , quando comparados com as placas de referência (Figura 6.2 A e 6.2B). Concluímos que GB poderá estar a proteger as células por indução de RH, porque os extratos não protegeram os mutantes  $rhp51$  e  $rad51$  que são afetados na RH.

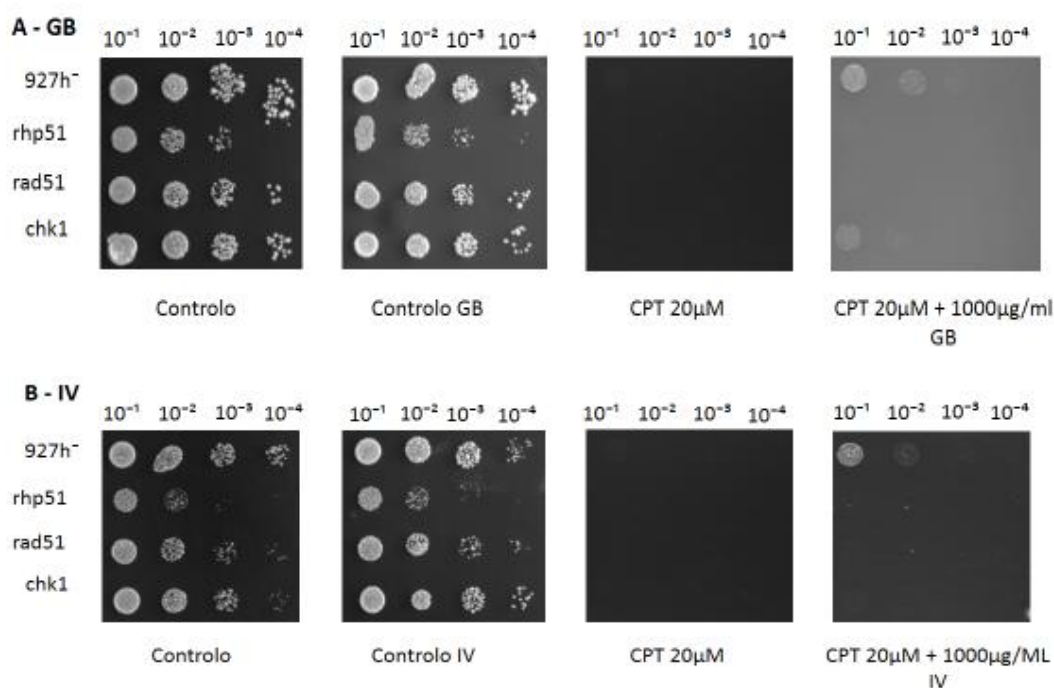


Figura 6.2 - Extratos de GB e IV protegem as células, de *Sch. pombe* da estirpe  $972\text{h}^-$  e do mutante  $chk1$ , de stresse genotóxico induzido por CPT. As células de  $972\text{h}^-$ , e os mutantes  $rhp51$ ,  $rad51$  e  $chk1$  foram diluídas seriadamente até  $10^{-4}$  e  $5 \mu\text{l}$  de cada diluição foi colocado em placas com meio YD sólido, com incorporação de  $20 \mu\text{M}$  de CPT e extrato de GB a uma concentração de  $1000 \mu\text{g/ml}$  (figura A) e com  $20 \mu\text{M}$  de CPT e extrato de IV a uma concentração de  $1000 \mu\text{g/ml}$  (figura B). As placas foram incubadas a  $30^\circ\text{C}$  durante 72 h, ao fim das quais as colónias foram observadas e fotografadas com o software *ChemiDoc™XRS*. Os resultados da figura correspondem a uma experiência representativa de três experiências independentes.

## 6.2– Efeito de extratos vegetais, GB, IV e MO sobre a viabilidade das células sob condições de stresse genotóxico, provocado pelo SNP

Para se estudar o efeito de outra substância química, o SNP, que já foi referido acima, que é uma sustância que libera NO. O NO é uma molécula importante em sistemas biológicos, porque age como uma molécula sinalizadora e é um efetor importante no sistema nervoso, imunológico e cardiovascular. Os seus efeitos no organismo variam consoante as concentrações e a capacidade celular, porque a baixas concentrações apresenta efeitos de proteção do organismo, enquanto que a concentrações que excedem a capacidade antioxidante das células pode levar à morte celular, particularmente por formar, por exemplo, peroxinitrito e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [19,22]. Para este estudo foi utilizado outro modelo biológico a levedura *Sch. pombe*, estirpe selvagem 972h<sup>-</sup>.

Uns ensaios foram realizados, em que, em todos os casos, as células foram tratadas previamente com os respetivos tratamentos, ou seja, SNP a 300mM e diferentes concentrações de extrato de GB (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml e 750 µg/ml), IV (50 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml e 750 µg/ml) e MO (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml). As culturas foram incubadas a 30 °C, 200rpm, durante 90 minutos. Ao longo dos 90 minutos, foram colhidas alíquotas de 30 em 30 min, diluiu-se seriadamente (10<sup>-4</sup>) e espalhou-se, em meio YD sólido a fim de se observar a viabilidade celular, dada pelo crescimento ou ausência de crescimento de colónias, ao longo do tempo, quando comparadas com as placas de referência. Foram consideradas placas de referências aquelas que não levavam qualquer substância tóxica, como controlo negativo e controlo com o extrato vegetal, em questão. A que levava apenas a substância tóxica, SNP, foi considerado controlo positivo.

Os resultados que obtivemos indicam-nos que o SNP quando em contacto com as células de *Sch. pombe* levam a uma perda de viabilidade celular, como se verifica pela falta de proliferação celular, nas placas de controlo positivo quando comparadas aos controlos negativos, onde as células não levam tratamento com substâncias tóxicas (Figura 6.3). Da análise dos resultados, verificamos, relativamente ao comportamento das células, na presença dos extratos, que as células quando expostas apenas ao extrato de GB e MO não sofrem perda de viabilidade celular, mas estes quando adicionados às culturas de células tratadas com SNP aumentam a perda de viabilidade celular, drasticamente, à medida que aumenta a concentração de extrato (Figura 6.3A e 6.3B). Verifica-se um efeito sinérgico por parte do extrato de GB e de MO. Já o extrato de IV mostra um efeito contrário, aos outros extratos, ou

seja, a diminuição da viabilidade celular é menor, quando adicionado a células que são tratadas com SNP, comparativamente aos controlos (Figura 6.3C). Conclui-se que o extrato de GB e de MO potenciam o efeito provocado pelo SNP, apesar dos extratos GB e MO quando atuam sozinhos não provocam perda de viabilidade celular, como se visualiza nas placas tratadas apenas com os extratos. Já o extrato de IV protege contra os danos provocados pela mesma droga, SNP.

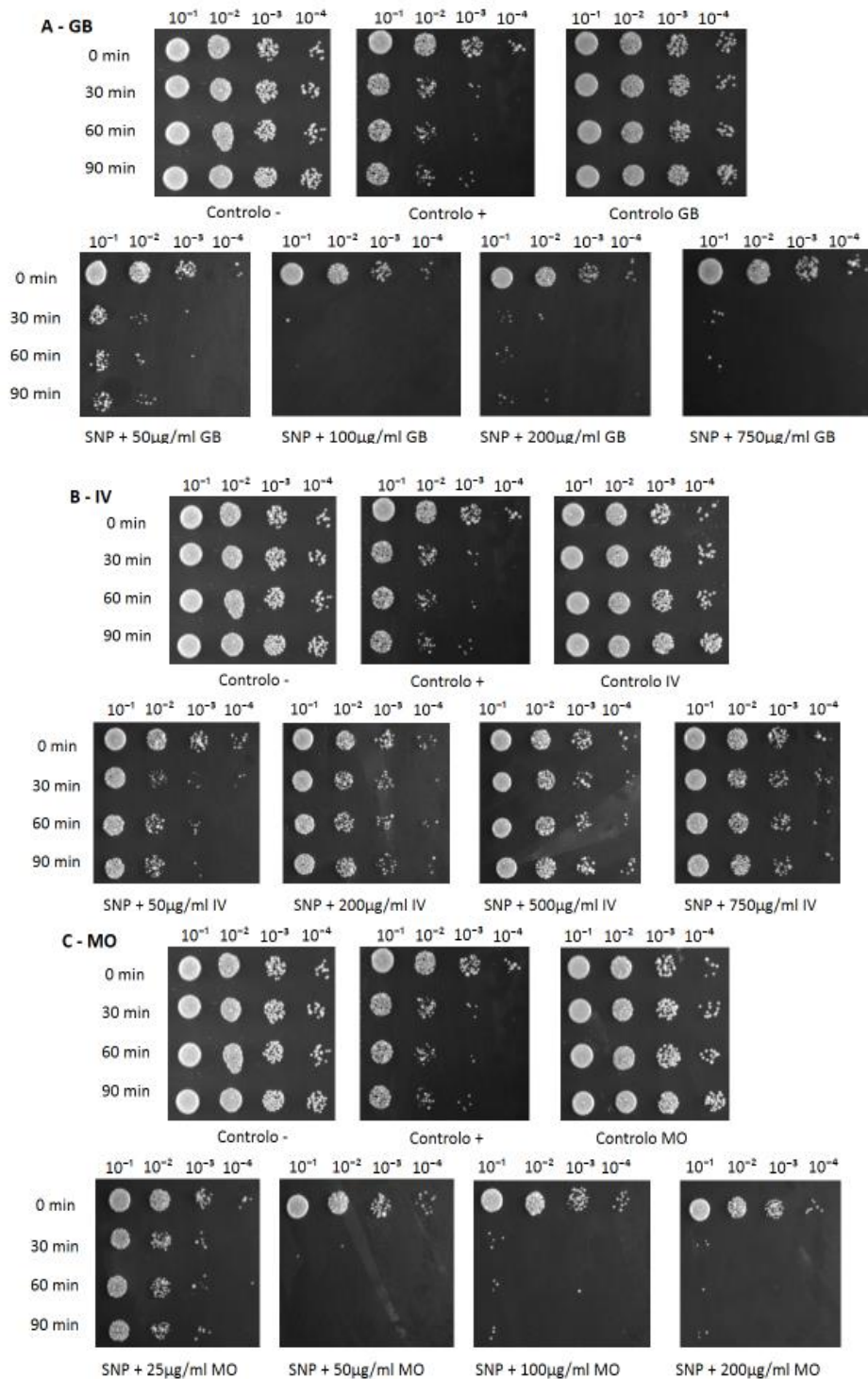


Figura 6.3 - Viabilidade celular na presença de SNP e de SNP com extratos de GB, IV ou MO, de *Sch. pombe*, da estirpe 972h<sup>-</sup>. As células foram incubadas com 300 mM de SNP e com extrato de GB a diferentes concentrações: 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml e 750 µg/ml (figura A), com 300 mM de SNP e com extrato de MO a diferentes concentrações: 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml (figura B) e com 300 mM de SNP e com extrato de IV a diferentes concentrações: 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml e 750 µg/ml (figura C). A cada tempo de colheita (0min, 30min, 60min e 90min) uma alíquota de 100µL foi colhida, diluída serialmente até 10<sup>-4</sup> e 5 µl de cada diluição colocados em meio YD sólido. As placas foram incubadas a 30°C durante 72 h, ao fim das quais as colônias foram observadas e fotografadas com o *software ChemiDoc™XRS*. Os resultados da figura correspondem a uma experiência representativa de três experiências independentes.

Outro ensaio foi realizado e incluímos, para além da estirpe selvagem 972h<sup>-</sup> (como um termo de comparação), os mutantes afetados na recombinação homóloga, desta mesma estirpe. Os mutantes utilizados foram o *rhp51*, *rad51* e *chk1*.

Em todos os casos, as células foram tratadas previamente com 300 mM SNP e extrato de GB a 5%. As culturas foram incubadas a 30 °C, 200 rpm, durante 120 min. Ao longo dos 120 min, foram colhidas alíquotas, em diferentes pontos de tempo (de 30 em 30 min), diluiu-se (10<sup>-4</sup> diluição) e espalhou-se, em meio YD sólido a fim de observar a viabilidade celular, dada pelas colónias ou ausência de colónias, ao longo do tempo, quando comparadas com as placas de referência. Foram consideradas placas de referências aquelas que não levavam qualquer substância tóxica, como controlo negativo e controlo com o extrato vegetal, em questão. A que continha apenas a substância tóxica, SNP, foi considerada como controlo positivo.

Da análise, verificou-se que o SNP, ao longo de 120 min, a uma concentração elevada provoca perda de viabilidade celular, em cultura de células de *Sch. pombe*, como se pode observar nas placas de controlo positivo (Figura 6.4). Em relação ao efeito do extrato vegetal, GB, verifica-se que não provocam perda de viabilidade celular, como se observa nas placas que apenas contêm apenas GB. Um dos objetivos era observar o comportamento do extrato de GB quando adicionados a suspensões celulares, afetadas em processos de reparação de DNA, em contacto com o SNP e da análise dos resultados verificou-se que GB juntamente com o SNP provoca uma drástica perda de viabilidade celular nas células de 972h<sup>-</sup> e do mutante *chk1*, quando comparados com os respetivos controlos (Figura 6.4A e 6.4D). Nos mutantes *rhp51* e *rad51*, que estão afetados na RH, verifica-se perda de viabilidade celular, quando é administrado GB juntamente com SNP às células, mas comparado com 972h<sup>-</sup> e *chk1*, essa perda de viabilidade é muito menor (Figura 6.4B e 6.4C), apesar de *rhp51* apresentar uma viabilidade mais semelhante a 972h<sup>-</sup> e *chk1*.

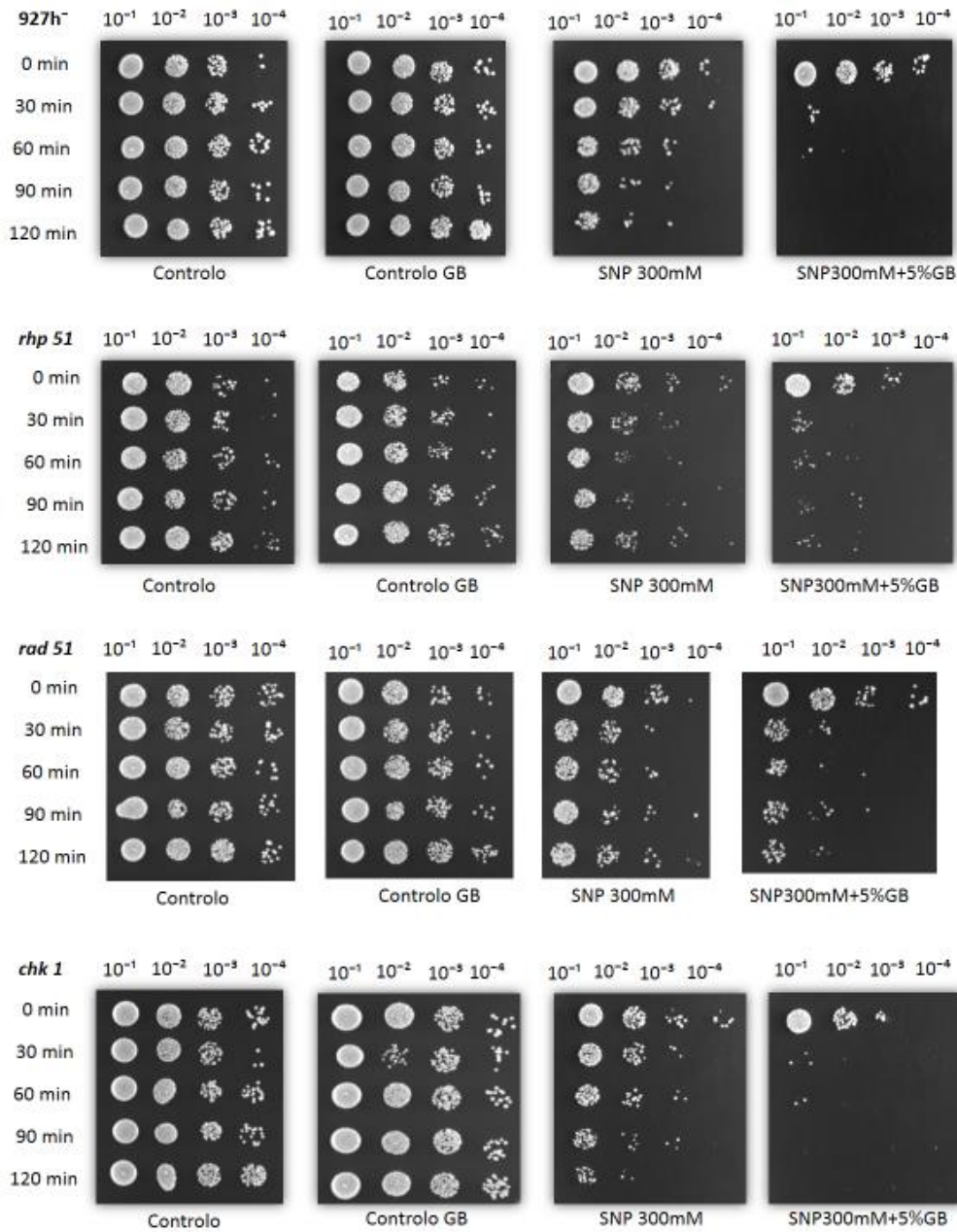


Figura 6.4 - Viabilidade celular na presença de SNP e de SNP com extratos de GB, IV ou MO, de *Sch. pombe*, da estirpe 927h<sup>-</sup> e as estirpes mutantes, *rhp51*, *rad51* e *chk1*. As células foram incubadas com 300 mM de SNP e com extrato de GB a 5%. A cada tempo de colheita, diluída serialmente até 10<sup>-4</sup> e 5 µl de cada diluição colocados em meio YD sólido. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 h, ao fim das quais as colónias foram observadas e fotografadas com o *software ChemiDoc™XRS*. Os resultados da figura correspondem a uma experiência representativa de três experiências independentes.

## 7 – Discussão

Através deste trabalho, pretendeu-se caracterizar a atividade antígenotóxica, de extratos vegetais, como o de folhas de *Ginkgo biloba*, contra stresse genotóxico, induzido por CPT e SNP. Neste trabalho também se investigou os efeitos de outros extratos vegetais, como *Dittrichia viscosa* e *Melissa officinalis*, com potencial atividade antígenotóxica, comparativamente ao extrato de *Ginkgo biloba*. Para este trabalho foram usados dois modelos biológicos, *S. cerevisiae* e *Sch. pombe*, porque são organismos que oferecem vantagens de simples manipulação laboratorial, estirpes genéticas mutantes e uso de ferramentas genéticas disponíveis, simples e menos dispendiosas.

A camptotecina, pela literatura, é uma substância usada em quimioterapia, porque tem como alvo molecular a topoisomerase I e os seus efeitos citotóxicos são específicos da fase S, resultando em quebras de cadeia dupla e morte celular, logo é uma substância que provoca stresse genotóxico [15]. Trabalhos anteriores, indicam-nos que GB apresenta diversas atividades biológicas, como eliminação de radicais livres, propriedades antitumorais, efeitos protetores do sistema nervoso, vascular e cerebral [44] e atividade antígenotóxica [74]. Após explorarmos a literatura para compostos naturais com atividade antígenotóxica, escolhemos duas plantas utilizadas em medicina tradicional, *Dittrichia viscosa* e *Melissa officinalis*, onde a sua atividade antígenotóxica, ainda, não foi amplamente estudada. O extrato de IV está descrito como um extrato que apresenta propriedades anticancerígenas, antibacterianas, anti-inflamatória, hepatoprotetora e uma forte atividade antioxidante [49], mas elevadas concentrações de IV (10 mg/ml) foram analisadas e apresentaram atividade citotóxica e genotóxica, sendo necessário salientar que o modelo biológico usado foi diferente [50]. O extrato de MO é relatado por apresentar efeitos sedativos, anti-espasmolíticos, antibacterianos, anti-inflamatório, antioxidantes e neuroprotetores, e estudos revelam que MO tem propriedades antígenotóxica e antimutagénicas [54]. Os nossos resultados, com *S. cerevisiae*, mostraram que as células são suscetíveis ao CPT, quando as células estão expostas a concentrações mais elevadas e em contacto permanente com CPT (Figura 5.1), mas o extrato de GB, IV e MO juntamente com CPT não apresentaram qualquer efeito sobre a viabilidade celular (Figura 5.1 e 5.2). Como CPT é uma droga que causa stresse genotóxico, por meio de quebras de cadeia dupla de DNA e, como já foi descrito, as DSB's são reparadas, maioritariamente, através de processos de recombinação homóloga, os nossos resultados

podem ser indicadores de que os extratos utilizados podem inibir os processos de reparação de danos de DNA ou componentes essenciais para esses processos ou ainda que a exposição a elevadas concentrações de CPT levem a danos celulares irreversíveis (Figura 5.1 e 5.2). Neste trabalho, utilizamos outra substância, o SNP, que provoca stresse genotóxico. Os danos provocados, ao nível do DNA, por esta substância, derivam da libertação de NO. O NO é um sinalizador intra e intercelular que pode atuar por diferentes vias: como ativador da guanil ciclase, que produz guanosina monofosfato cíclico, que atua, no organismo, como segundo mensageiro, que regula numerosos eventos celulares, como a participação direta na ativação de proteínas que desempenham papéis importantes na apoptose [19, 22, 25]. Pode, ainda, interagir com o citocromo C-oxidase (principal fonte do anião superóxido), na mitocôndria, provocando stresse oxidativo, quando em concentrações excessivas [23,25]. Assim, o NO pode reagir com diferentes espécies, dentro do hospedeiro, originando RNS, que provocam danos no DNA [8]. Os nossos resultados, com *S. cerevisiae*, indicaram que o SNP, quando adicionado às células por um longo período de tempo provoca perda de viabilidade celular (Figura 5.4). Relativamente aos extratos vegetais estudados, GB, IV e MO, não apresentam qualquer efeito sobre a viabilidade celular, mas quando GB é adicionado juntamente com SNP parece potenciar o efeito da droga, apesar de não ser estatisticamente significativo, quando comparado ao respetivo controlo (Figura 5.4). O extrato de MO juntamente com SNP tem o mesmo comportamento que GB juntamente com o SNP, só que a perda de viabilidade celular por parte de MO com SNP não é tão acentuada (Figura 5.3C). Este comportamento de GB ou MO com SNP pode ser um indicador de que estes dois extratos apresentem uma ação sinérgica, ou seja, a ação simultânea e cooperação entre SNP e GB ou MO apresentam um efeito maior de perda de viabilidade celular, do que quando são aplicados isoladamente, o que pode permitir o desenvolvimento de terapêuticas mais eficientes e diminuir os efeitos secundários indesejados, associados a essas terapêuticas. Com os resultados obtidos na viabilidade celular e para uma melhor compreensão dos danos que os agentes provocam ao nível do DNA, recorreremos ao ensaio cometa, que nos permite quantificar as lesões, provocadas pelos agentes genotóxicos CPT e SNP e detetar a existência de efeitos de reparação do DNA, por parte do extrato vegetal GB, em células individualizadas. A análise dos nossos resultados indicou-nos que CPT e SNP são drogas que provocam danos no DNA, mas que o extrato de GB juntamente com os agentes genotóxicos provocava uma diminuição, estatisticamente significativa, das caudas dos cometas, ou seja, diminui os danos no DNA, à medida que aumenta a concentração de extrato, quando comparados com o respetivo controlo (Figura 5.5A e 5.5C). Estes resultados levam-nos a crer que GB apresenta proteção contra o

stresse genotóxico, provocado por CPT e SNP. Estes resultados não se correlacionam diretamente com os resultados observados, na viabilidade e podem ser explicados pelo facto de na experiência da viabilidade (Figura 5.4) as células estão expostas ao SNP por um longo período de tempo e a perda de viabilidade pode resultar de outras substâncias tóxicas, como cianeto, porque como é uma molécula muito instável e pode quebrar-se e produzir cianeto que é bastante tóxico [19] e os resultados do ensaio cometa apresentam significância estatística relevante. O facto de nos ensaios de viabilidade com CPT e SNP não se verificar correlação com a genotoxicidade pode ter a ver com a parede celular da levedura *S. cerevisiae* que dificulta a entrada das moléculas do extrato de GB, isto porque no ensaio cometa quando adicionamos os tratamentos a parede celular é previamente removida.

Neste trabalho, utilizou-se outro modelo biológico, *Sch. pombe*, com o mesmo objetivo de avaliar o efeito de extratos vegetais, com propriedades antígenotóxicas contra drogas que provocam stresse genotóxico, o CPT e o SNP. Da análise dos nossos resultados, foi possível observar-se o efeito marcado da perda de viabilidade celular, quando as células estavam expostas permanentemente ao CPT (Figura 6.1). Relativamente aos extratos, verificou-se que GB e IV apresentaram proteção, quando administrados juntamente com CPT e comparados aos respetivos controlos (Figura 6.1). Como CPT causa quebras de cadeia dupla de DNA, que são reparadas essencialmente pelo processo de reparação de recombinação homóloga, testou-se o efeito protetor de GB e IV, por indução da capacidade de reparação de DSB's. Para tal, utilizou-se mutantes afetados em processos de reparação de DNA, sendo que *rhp51* e *rad51* são mutantes afetados na RH. Os resultados obtidos revelaram-nos que GB pode estar a proteger as células danificadas por indução de RH, porque o extrato não protegeu os mutantes *rhp51* e *rad51* (Figura 6.2). Este resultado é bastante promissor, porque existem muitas formas de se originarem quebras de cadeia dupla no DNA, desde radiação ionizante, como outras drogas para além de CPT (bleomicina, por exemplo), que causam instabilidade genómica e possível morte celular [75]. A terapia do cancro é a que mais interesse tem em compreender o processo RH, para fragmentar o DNA em células cancerígenas, como tal a terapia mais usada é as altas radiações e as drogas quimioterapêuticas que causam DSB's, para que as células cancerígenas morram. O grande problema é que estas terapêuticas não são totalmente específicas para células tumorais e afetam todas as células. Assim estes resultados podem ser interessantes para que a terapia do cancro se torne mais eficaz e com menos efeitos indesejados. O SNP, também foi testado, através deste modelo biológico e os resultados obtidos indicaram-nos que o SNP leva à perda de viabilidade celular (Figura 6.3), num menor

período de tempo, que em *S. cerevisiae* (Figura 5.4). Relativamente à análise dos resultados obtidos da administração dos extratos vegetais, verificou-se que GB e MO juntamente com o agente genotóxico leva a uma perda de viabilidade celular drástica, maior que a perda de viabilidade observada nas células que apenas estão em contacto com SNP (Figura 6.3A e 6.3B). Assim, GB e MO apresentam um efeito sinérgico juntamente com SNP, dependente da dose. Este é um resultado interessante, porque pode levar a terapêuticas mais eficientes. Em relação ao extrato de IV, observou-se o efeito contrário ao extrato de GB e MO, ou seja, IV mostrou proteger as células contra os danos provocados pelo SNP (Figura 6.3C). O mecanismo de ação antígenotóxico de IV pode ser um efeito direto sobre a inativação de SNP ou pelas suas propriedades antioxidantes pode eliminar espécies reativas, que leva ao aumento da viabilidade celular e diminui o dano de DNA sob stresse genotóxico. Como GB juntamente com o SNP, na viabilidade apresenta um efeito sinérgico, mas no ensaio cometa apresentava proteção contra as células danificadas, testou-se o efeito de GB com mutantes afetados em mecanismos de reparação de danos de DNA, como *rhp51*, *rad51* e *chk1* (Figura 6.4). Dos resultados obtidos, observou-se que *rhp51* apresentou menos viabilidade celular, comparativamente ao *rad51* e deveriam comportar-se de igual modo (Figura 6.4B e 6.4C). Estes resultados podem ser explicados pelo facto de *rhp51* ser um mutante em que o gene RHP51 foi apenas silenciado e pode reverter tornando-se funcional, enquanto que *rad51* é um mutante em que o gene RAD51 (com a mesma função de RHP51) foi totalmente removido. Assim, como GB juntamente com SNP apresenta um efeito sinérgico, os resultados sugerem que o efeito sinérgico está relacionado com o gene RAD51, daí *rad51* apresentar mais viabilidade celular e *rhp51* ser mais semelhante a *972h<sup>-</sup>* e *chk1* (Figura 6.4 A e 6.4 D). Como tal, o extrato de GB pode estar a induzir a RH (*rhp51* e *rad51* são mutantes afetados na RH) e isso pode levar a uma menor viabilidade, porque pode estar a conduzir recombinações ilegítimas, visto que RAD51/RHP51 são importantes na pesquisa de homologia, para o processo de RH reparar os danos no DNA.

## 8 – Conclusão

Com este trabalho experimental, podemos concluir que CPT quando administrada às células causa perda de viabilidade celular significativa. O extrato de *Ginkgo biloba* e de *Dittrichia viscosa* apresentam proteção contra os danos causados por CPT, enquanto que *Melissa officinalis* não apresenta qualquer efeito. A proteção das células observada, pelo GB parece ser através da indução do processo de recombinação homóloga.

Concluimos, também, que SNP também afeta, significativamente, a viabilidade celular das células, em concentrações mais elevadas. O extrato de GB e de MO apresentam um efeito sinérgico, ou seja, potenciam o efeito de perda de viabilidade celular do SNP, quando administrados em conjunto. Já pelo contrário, IV apresenta um efeito de proteção, nas células danificadas por SNP. O GB juntamente com SNP parece induzir a RH pela indução de recombinações ilegítimas, aumentando assim mais os danos do DNA.

Dos modelos biológicos utilizados, *Sch. pombe* mostrou ser um melhor modelo para este estudo, apresentando resultados mais significativos e claros do que os resultados obtidos através do modelo *S. cerevisiae*. Verifica-se que *Sch. pombe* é um organismo mais sensível às drogas genotóxicas e extratos vegetais avaliados.

## 9 – Perspetivas Futuras

Para se compreender melhor a atividade biológica do extratos vegetais, GB, IV e MO, seria importante fazer a sua análise química e testar os compostos químicos, que pela literatura, pareçam ser responsáveis pelos efeitos que os extratos vegetais produziram, ou seja, realizar os mesmos ensaios, deste trabalho, com os compostos puros e compara-los à atividade do extrato.

Também seria importante avaliar os mecanismos de ação das drogas utilizadas, CPT e SNP, e os mecanismos de proteção ou sinérgicos, obtidos pelos extratos vegetais, neste trabalho, recorrendo, para tal, à citometria de fluxo, que nos permite avaliar e quantificar a resposta de células individuais ao stresse provocado pelas drogas genotóxicas, bem como a resposta das células em contacto com s extratos vegetais. O recurso a esta ferramenta seria importante, especificamente, no estudo de ciclo celular, no potencial da membrana interna da mitocôndria e do potencial da parede celular, como também no estudo das espécies reativas.

Quando o estudo dos efeitos destes extratos vegetais, contra as drogas genotóxicas obtivesse resultados significativos, claros e sem deixar qualquer dúvida, seria interessante passar para estudos com linhas celulares e posteriormente para mamífero, para no final se obter produtos que possam ser consumidos pelos humanos, no sentido de melhorar o estilo de vida, em termos de saúde.

O estudo de novas drogas genotóxicas com os extratos de GB, IV ou MO, ou a pesquisa de outros extratos vegetais com atividade antígenotóxica são importantes para a descoberta de novas terapêuticas e minimizar os efeitos secundários que muitos produtos farmacológicos causam.

## 10 – Referências Bibliográficas

- [1] -Watson, J. D. e Crick, F. H. C. (1953) “Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid.” *Nature* Vol.171, pp. 737–738;
- [2] – Pearce, A.K. e Humphrey, T. C. (2001) “Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways.” *Trends Cell Biology* Vol.11, pp. 426-433;
- [3] – Pan X, Ye P, Yuan D.S., Wang, X., Bader J.S., Boeke JD. (2006) “A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.” *Cell* Vol.124, Nº 5, pp.1069-81;
- [4] - Balestardi, A., Confalonieri M., Macovei A., Donà M. e Carbonera D. (2011) “Genotoxic stress and DNA repair in plants: emerging functions and tools for improving crop productivity.” *Plant Cell Reports* Vol. 30, Nº3, pp. 287-95;
- [5] – Soria, G., Polo, S. E. e Almouzni, G. (2012) “Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response.” *Molecular Cell* Vol. 46, Nº 6, pp. 722-734;
- [6] – Veskokouk, A., Tsatsakis, A.M. e Kouretas, D. (2011) “Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration.” *Cell stress and chaperones* Vol.17, pp. 11-21;
- [7] – Darzynkiewicz, Z. e Balazs, E. A. (2012) “Genome integrity, stem cells and hyaluronan.” *AGING* Vol. 4, Nº 2, pp. 78-88;
- [8] – Horan, S., Bourges, I. e Meunier, B. (2006) “Transcriptional response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*” *Yeast* Vol. 23, pp. 519-535 ;
- [9] – Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H. e Loeb, L. A. (2004) “Environmental and chemical carcinogenesis.” *Seminar Cancer Biology* Vol.14, Nº 6,pp.473–486 ;
- [10] – Goldman, R. e Shields, P. (2003) “Food Mutagens.” *The Journal of Nutrition* Vol.133, pp. 965-973;

[11] – Dexheimer, T. (2012) “DNA Repair Pathways and Mechanisms” L. A. Mathews (Ed) Springer Science + Business Media, Hardcover, pp.19-32 ;

[12] – Hsie, A., Recio, L., Katz, D. S., Lee, C. Q., Wagner, M. e Schenley, R. L. (1986) “Evidence for reactive oxygen species inducing mutations in mammalian cells” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.83, pp. 9616-9620;

[13] – Lozza, M. e Welinger, R. (2009) “A novel approach for organelle-specific DNA damage targeting reveals different susceptibility of mitochondrial DNA to the anticancer drugs camptothecin and topotecan.” *Nucleic Acids Research* Vol. 37, Nº 4;

[14] – Zeng, C., Zhang, X.J , Lin, K. Y., Ye, H., Feng, S. Y., Zhang, H. e Chen, Y. Q. (2012) “Camptothecin induce apoptosis in cancer cells via MicroRNA-125b-mediated mitochondrial pathways” *Molecular Pharmacology* Vol. 81, Nº 4, pp. 578-586;

[15] – Staker, B., Hjerrild, K., Feese, M. D., Behnke, C. A., Burgin, A. B. Jr. e Stewart, L. (2002) “The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog” *Pnas* Vol.99, Nº 24, pp. 15387–15392;

[16] – Fiorani, P., Amatruda, J.F., Silvestri, A., Butler, R.H., Bjornsti, M.A. e Benedetti, P. (1999) “Domain Interactions Affecting Human DNA Topoisomerase I Catalysis and Camptothecin Sensitivity” *Molecular Pharmacology* Vol.56, pp. 1105-1115;

[17] – Attia, S., Aleisa, A. M., Bakheet, S. A., Al-Yahya, A. A., Al-Rejaie, S. S., Ashour, A, E. e Al-Shabanah, O. A.(2009) “Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of micronuclei formation induced by camptothecin, topotecan, and irinotecan” *Environmental and Molecular Mutagenesis* Vol.50, Nº 2;

[18] – Chiuchetta, S. e Castro-Prado, M. (2005) “Genotoxic evaluation of sodium nitroprusside in *Aspergillus nidulans*.” *Genetics and Molecular Biology* Vol. 28, Nº 4, pp. 798-803;

[19] – Chiusa, M., Timolati, F., Perriard, J. C., Suter, T. M. e Zuppinger, C. (2012) “Sodium nitroprusside induces cell death and cytoskeleton” *European Journal of Histochemistry* Vol 56, pp. 90-95;

[20] - Gow, A. e Brown, A. (2011) “Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in yeast” *Biochem Soc Trans*, UK, Vol.39, Nº 1, pp. 219–223;

[21] – Leber, A., Hemmens, B., Klösch, B., Goessler, W., Raber, G., Mayer, B. e Schmidt, K.(1999) “Characterization of Recombinant Human Endothelial Nitric-oxide Synthase Purified from the Yeast *Pichia pastoris*.” *The Journal Biological Chemistry* Vol. 274, Nº 53, pp. 37658-64;

[22] – Planchet, E. e Kaiser, WM. (2006) “Nitric Oxide (NO) detection by DAF fluorescence” *Journal Experimental Botany* Vol. 57, Nº 12, pp. 3043-3055;

[23] – Bastianetto, S., Zheng, W. H. e Quirion, R. (2000) “The Ginkgo biloba Extract (EGb 761) Protects and Rescues Hippocampal Cells Against Nitric Oxide-Induced Toxicity: Involvement of Its Flavonoid Constituents and Protein Kinase C” *Journal Neurochemistry* Vol. 74, Nº 6, pp. 2268-77;

[24] - Kanadia, R., Kuo, W. N., McNabb, M. e Botchway, A. (1998) “Constitutive Nitric Oxide Synthase in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Biochemistry e Molecular Biology International* Vol. 45, Nº6, pp. 1081-1087;

[25] – Nasuno, R., Aitoku, M., Manago, Y., Nishimura, A., Sasano, Y. e Takagi, H. (2014) “Nitric oxide mediated antioxidative mechanism in yeast through the activation of transcription factor Mac1” *Plos one* Vol.9, Nº11, pp. 1-18;

[26] – Almeida, B., Buttner, S., Ohlmeier, S., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., Osório, N. S., Kollau, A., Mayer, B., Leão, C., Laranjinha, J., Rodrigues, F., Madeo, F. e Ludovico, P. (2007) “No-mediated apoptosis in yeast” *Journal of Cell Science* Vol.120, Nº18, pp. 3279-3288 ;

[27] – Sirbu, B. M. e Cortez, D. (2013) “DNA Damage Response: Three Levels of DNA Repair Regulation” *Cold Spring Harb Perspect Biology* Vol.5, Nº8;

[28] – Choi, K. e Henderson, I. R. (2015) “Meiotic recombination hotspots – a comparative view” *Plant Journal* Vol.83, Nº1, pp. 52-61;

[29] – Sung, P. e Klan, S. (2006) “Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol.7, pp. 739-750;

[30] – Sam Filippo, J., Sung, P. e Klein, H. (2008) “Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination” *Annual Review of Biochemistry* Vol.77, pp. 229-57;

[31] – Lettier, G., Feng, Q., Mayolo, A., Erdeniz, N., Reid, R., Lisby, M., Mortensen, U. e Rothstein, R. (2006) “The Role of DNA Double-Strand Breaks in Spontaneous Homologous Recombination in *S. cerevisiae*” *Plos Genetics* Vol.2, Nº11, pp. 1773-1786;

[32] – Ajayi, I. A., Ajibade, O. e Oderinde, R. A. (2011) “Preliminary phytochemical analysis of some plant seeds” *Research Journal of Chemical Sciences* Vol.1, Nº3, pp. 58-62;

[33] – Ruíz-Martinez, J., Ascacio, J. A., Rodriguez, R., Morales, D. e Aguilar, C. N. (2011) “Phytochemical screening of extracts from some Mexican plants used in traditional medicine” *Journal of Medicinal Plants Research* Vol.5, Nº12, pp. 2791-2797;

[34] - Visweswari, G., Christopher, R. e Rajendra, W. (2013) “Phytochemical screening of active secondary metabolites present in *Withania somnifera* root: role in tradicional medicine” *International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research* Vol.4, Nº7, pp. 2770;

[35] – Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, Brijesh, Tiwari, R., Charkaboty e Dhama, K. (2014) “Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay” *BioMed Research International* Vol.2014, pp. 1-19;

[36] – Seeger, A., Shah, U. K., Mikhail, J.M., Nelson, B. C., Marquis, B. J., Doak, S. H., Johnson, G. E., Griffiths, S. M., Carmichael, P.L., Scott, S. J., Scott, A. D. e Jenkins, G. J. (2012) “Pro-oxidant Induced DNA Damage in Human Lymphoblastoid Cells: Homeostatic Mechanisms of Genotoxic Tolerance” *Toxicological Science* Vol.128, Nº2, pp. 387-397;

[37] – Fu, P., Xia, Q., Lin, G. e Chou, M. (2002) “Genotoxic Pyrrolizidine Alkaloids — Mechanisms Leading to DNA Adduct Formation and Tumorigenicity” *International Journal of Molecular Science* Vol.3, Nº 9, pp. 948-964;

[38] – Ruan, J., Yang, M., Fu, P., Ye, Y. e Lin, G. (2014) “Metabolic Activation of Pyrrolizidine Alkaloids: Insights into the Structural and Enzymatic Basis” *Chemical Research in Toxicology* Vol.27, Nº6, pp. 1030-1039;

[39] – Kennedy, D. O. e Wightman, E. L. (2011) “Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function” *Advances in Nutrition: An International Review Journal* Vol.2, Nº1, pp. 32-50;

[40] – Sakagami, Y., Ozaki, T. e Mori, M. (2012) “Synergistic Effect between Hinokitiol and Surfactants (or Terpene Alcohols) Against Some Bacteria” *Journal of Food Science and Engeneering*;

- [41] – Michalowicz, J. e Duda, W. (2007) “Phenols – Sources and Toxicity” *Polish Journal of Environmental Study* Vol.16, Nº3, pp. 347-362;
- [42]- Smith, C. J., Perfetti, T.A., Morton, M. J., Rodgman, A., Garg, R., Selassie, C. D. e Hansch, C. (2002) “The Relative Toxicity of Substituted Phenols Reported in Cigarette Mainstream Smoke” *Toxicology Science* Vol.69, Nº1, pp. 265-78;
- [43] – Mahadven, S e Park, Y. (2008) “Multifaceted Therapeutic Benefits of Ginkgo biloba L.: Chemistry, Efficacy, Safety, and Uses” *Journal of Food Science* Vol.73, Nº1, pp.1750-3841;
- [44] – Jin, Y., Wen, J., Garg, S., Liu, D., Zhou, Y., Teng, L. e Zhang, W. (2013) “Development of a novel niosomal system for oral delivery of Ginkgo biloba extract” *International Journal Nanomedicine* Vol.8, pp. 421-430;
- [45] – Ren, D. C., Du, D. H. e Zhang, J. T. (2002) “Protective Effect of Ginkgo Biloba Extract on Endothelial Cell Against Damage Induced by Oxidative Stress” *Journal Cardiovascular Pharmacology* Vol.40, Nº6, pp. 809-814;
- [46] – Hibatallah, J., Carduner, C. e Poelman, M. C. (1999) “In-vivo and in-vitro assessment of the free-radical-scavenger activity of Ginkgo flavone glycosides at high concentration.” *Journal Pharmacy Pharmacology* Vol.51, Nº12, pp. 1435-1440;
- [47] – Hen, J., Lin, J., Li, J., Zhang, J. H., Sun, X. M. e Zeng, C, M. (2009) “Dual Effects of Ginkgo biloba Leaf Extract on Human Red Blood Cells” *Basic Clinic Pharmacology Toxicology* Vol.104, Nº2, pp. 138-144;
- [48] – Talib, W. H., Zarga, M. H. e Mahasneh, A. M. (2012) “Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula viscosa*” *Molecules* Vol.17, Nº3, pp. 3291-3303;
- [49] – Samar, A., Kaloo, S. A., Singh, S. e Altaf, T. (2013) “MEDICINAL IMPORTANCE OF GENUS INULA- A REVIEW” *International Journal of Current Research and Review* Vol.5, Nº2, pp. 20-26;
- [50] – Çelik, T. e Aslantürk, Ö. (2010) “Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with Allium test” *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Vol.2010, pp. 1-8;

[51] – Argiropoulos, D. e Müller, J. (2013) “Kinetics of change in colour and rosmarinic acid equivalents during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.)” *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* Vol.1, N°1, pp. 1-22;

[52] – Carvalho, N., Frydberg, M., Corrêa-Angeloni, Dimer, D., Leffa, Moreira J., Nicolau V., Amaral P., Rossatto A. e Andrade, V. (2011) “Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice” *Genetics and Molecular Biology* Vol.34, N°2, pp. 290-297;

[53] – Noquchi-Shinohara, M., Ono, K., Hamaguchi, T., Iwasa, K., Nagai, T., Kobayashi, S., Nakamura, H. e Yamada, M. (2015) “Pharmacokinetics, Safety and Tolerability of *Melissa officinalis* Extract which Contained Rosmarinic Acid in Healthy Individuals: A Randomized Controlled Trial” *Plos one* Vol.10, N°5, pp. 1-13;

[54] – Kamdem, J., Athayde, M. L., Adeniran, A., Boligon, A. A., Klimaczewski, C. V., Elekofehinti, O. O., Hassan, W., Ibrahim, M., Waczuk, . E. P. e Meinerz, D. F. (2013) “Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection” *Industrial Cops and Products* Vol.51, pp. 26-34;

[55] – Narayan, P., Ehsani, S. e Lindquist, S. (2014) “Combating neurodegenerative disease with chemical probes and model systems” *Nature Chemical Biology* Vol.10, N°11, pp. 911-920;

[56] – Santos, A. X. e Riezman, H. (2012) “Yeast as a model system for studying lipid homeostasis and function” *FEBS letters* Vol.586, N°18, pp. 2858-2867;

[57] – Reis, V. R., Bassi, A. P., Silva, J. C. e Ceccato-Antonini, S. R. (2014) “Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation” *Brazilian Journal of Biology* Vol.44, N°4, pp. 1121-1131;

[58] – Rubin G., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor, Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S. E., Chervitz, S. A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R. F., Gelbart, W. M., George, R. A., Goldstein, L. S., Gong, F., Guan, P., Harris, N. L., Hay, B. A., Hoskins, R. A., Li, J., Li, Z., Hynes, R. O., Jones, S. J., Kuehl, P. M., Lemaitre, B., Littleton, J. T., Morrison, D. K., Mungall, C., O'Farrell, P. H., Pickeral, O. K., Shue, C., Voshall, L. B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X. H. e Lewis, S.

(2000) “Comparative Genomics of the Eukaryotes” *Science*, Vol.287, N°5461, pp. 2204–2215;

[59] - Botstein, D., Chervitz, S. e Cherry J. (1997) “Yeast as a Model Organism” *Science* Vol.277, N°5330, pp. 1259–1260;

[60]- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A. e Alves R. (2011) “Saccharomyces cerevisiae as a Model Organism: A Comparative Study” *Plos One* Vol6, pp. 1-10;

[61] – Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B. C., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Park, J., Skrzypek, M. S., Simison, M., Weng, S. e Wong, E. D. (2012) “Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast” *Nucleic Acids Research* Vol40, pp. 700-705;

[62]- Almeida, B., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., Rodrigues, F. e Ludovico, P. (2008) “Drug-induced apoptosis in yeast” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* Vol.1783, N°7, pp. 1436-1448;

[63] – Castello, P. R., David, P. S., McClure, T., Crook, Z. e Poyton, R. O. (2006) “Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes.” *Cell Metabolism* Vol.3, N°4, pp. 277-87;

[64] – Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O’Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schäfer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M, Düsterhöft, A, Fritz, C, Holzer, E, Moestl, D, Hilbert, H, Borzym, K, Langer I, Beck A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dréano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S. J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S. M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V. A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R. R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sánchez, M., del Rey, F., Benito, J., Domínguez, A., Revuelta, J. L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S. L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W. R., Paulsen,

I., Potashkin, J., Shpakovski, G. V., Ussery, D., Barrell, B. G. e Nurse, P. (2002) "The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*" *Nature* Vol.415, Nº6874, pp. 871-880;

[65] – Farlow, A., Long, H., Arnoux, S., Sung, W., Doak, T., Nordborg, M. e Lynch, M. (2015) "The spontaneous mutation rate in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*" *Genetics* Vol.10, Nº1534, pp. 1-14;

[66] – Wood, V., Harris, M. A., McDowall, M. D., Rutherford, K., Vaughan, B. W., Staines, D. M., Aslett, M., Lock, A., Bähler, J., Kersey, P. J. e Oliver, S. G. (2011) "PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast" *Nucleic Acids Research* Vol.40, pp. 695-699;

[67] – Frost, A., Elgort, M., Brandman, O., Ives, C., Collins, S., Miller-Vedam, L., Weibzahn, J., Hein, M., Poser, I., Mann, M., Hyman, A. e Weisman, J. (2012) "Comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* Genetic Interactions Reveals Functional Repurposing and Identifies New Organelle Homeostasis and Mitosis Control Genes" *Cell* Vol.149, Nº6, pp. 1339-1352;

[68] – Ball, C. e Cherry, J. (2001) "Genome comparisons highlight similarity and diversity within the eukaryotic kingdoms" *Current Opinion in Chemical Biology* Vol.5, Nº1, pp. 86-86;

[69] – Galkin, V. E., Wu, Y., Zhang, X. P., Qian, X., He, Y., Yu, X., Heyer, W. D., Luo, Y. e Egelman, E. H. (2006) "The Rad51/RadA N-terminal domain activates nucleoprotein filament ATPase activity". *Structure* Vol.14, Nº 6, pp. 983–92;

[70] – Klein, H. L. (2008) "The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells." *DNA Repair* Vol.7, Nº5, pp. 686-693;

[71] – Bartek, J. e Lukas, J. (2003) "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer" *Cancer Cell* Vol.3, Nº5, pp. 421-429;

[72] – Liu, G., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L. A. e Elledge, S. J. (2000) "Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint" *Genes Development* Vol.14, Nº12, pp. 1448-1459;

[73]- Zhang, Y. e Hunter, T. (2014) "Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy". *International Journal of Cancer e Journal International Du Cancer* Vol.134, Nº5, pp. 1013–23;

[74] – Marques, F., Azevedo F., Johansson, B. e Oliveira, R. (2011) “Stimulation of DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae* by Ginkgo biloba leaf extract” *Food Chemical Toxicology* Vol49, N°6, pp. 1361-1366;

[75] – Goodsell, D. (2005) “The Molecular Perspective: Double-Stranded DNA Breaks” *The Oncologist* Vol.10, N°5, pp. 361-362;

[76] – Mugoni, V. e Santoro, M. (2013) “Manipulating Redox Signaling to Block Tumor Angiogenesis” Chai, J. (Ed), *Infectious Diseases*, Book chapter, Itália, capítulo 3;

[77] - Filho, R. e Zilberstein, B. (2000) “Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções.” *Revista da Associação Médica Brasil* Vol46, N°3, pp. 265-271.

[78] - Grivicich, I.; Mans, D.R.A.; Peters, G.J. e Schwartzmann, G. (2001) “Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer” *Brazilian Journal of Medical Biological Research* Vol.34, N°9