

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação em Biologia Molecular

Apoptose induzida por extrato aquoso
de *Pteridium aquilinum* em células de
glândula submandibular humana (HSG)
e de epitélio bucal (OSCC-3)

Luciana Oliveira Pereira

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Biologia Molecular

Brasília, DF
2006

Trabalho realizado nos laboratórios de Biologia Molecular, de Microscopia Eletrônica e de Morfologia e Morfogênese do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Soraya Leal, Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Cláudio Eduardo de Oliveira Cavalcanti, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília. (suplente)

**Aos meus pais
e minhas irmãs**

Minha gratidão à vida, a maior de todas as oportunidades;

Aos meus pais, Célio e Neuza, sempre meus maiores exemplos de conduta, de moral, de afeto, de vida;

Às minhas irmãs, Patrícia e Isabela, pela convivência diária, que tanto me ensina e me faz feliz;

Aos demais familiares por serem pessoas tão queridas;

À Universidade de Brasília e a todos os mestres por minha formação acadêmica;

Ao meu querido orientador, o Prof. Dr. Marcio Poças, pelos valiosos ensinamentos desde o meu primeiro semestre de graduação. Obrigada por me ensinar, ao longo desses anos de agradável convivência e muito aprendizado, o que é “fazer ciência”. Considero-o responsável por despertar em mim o gosto pela pesquisa;

À minha querida co-orientadora, a Profa. Dra. Maria de Fátima Almeida Santos, que também me acompanha desde a iniciação científica. Aprendi muito com você e sua forma afetuosa de ensinar, várias vezes sentando-se comigo em frente aos meus resultados para discuti-los e para me mostrar a melhor maneira de escrever cientificamente;

Aos professores Dr. Cláudio Eduardo Cavalcanti e Dra. Soraya Leal, que compuseram a banca examinadora desta dissertação, pela leitura cuidadosa do meu trabalho e pelas valiosas observações e sugestões;

A todos os professores do Laboratório de Biologia Molecular, Andréa Maranhão, Élide Campos, Fernando Torres, Ildinete Pereira, Lídia Pepe, Marcelo Brígido, Marcos Silva e Maria Sueli Felipe por terem sempre atendido tão prontamente quando solicitei alguma explicação;

Ao Thiago, pelo trabalho em conjunto desde a iniciação científica, por sua maneira inteligente de trabalhar e pela amizade;

Ao Leandro, pela importante participação em muitos dos experimentos, pelo interesse em me ajudar sempre e pela amizade;

À Mariana, pelas várias colaborações, pelo trabalho em conjunto e pela agradável convivência;

Aos demais colegas do Laboratório de Biologia Molecular por me terem feito gostar ainda mais de ir ao laboratório, em especial Alexsandro, Hugo, Luciano, Alessandra, Rafael, Camila, Sérgio, Marciano, Bruno, Carine, Fabrício, André, Gina, Cecília, Pedro, Flávia, Crisinha, Mauro, Davi, Livônios, Rose, Vera, Larissa, Aldo, Simoneide, Loise, Patvet, Viviane, Saulo e Nádia;

À Izabel Cristina pela valiosa orientação em bioestatística nas várias vezes que solicitei;

À Profa Dra Sônia Bão, pela fundamental orientação em todas as etapas de processamento e análise em microscopia eletrônica. Obrigada pelo tempo dedicado, pela paciência e pelo rico aprendizado;

Ao Prof. Dr. Bergmann Ribeiro por sua boa disposição em esclarecer minhas dúvidas sempre que o procurei;

Aos colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Shélida, Carol, Leonora, Larissa, Eni, Bruno A., Bruno F., Gustavo, Marcelo e Saulo, pela simpatia com que me receberam no laboratório e por tudo que me aprendi com vocês durante os processamentos e análises de microscopia. Especial gratidão às colegas Shélida e Carol, pela colaboração na tão delicada ultramicrotomia;

Ao professor Dr. Jaime Santana, do Laboratório de Doença de Chagas pela autorização para utilização do citômetro de fluxo;

Ao Sócrates pela fundamental colaboração nas várias tardes de análises no citômetro de fluxo, pela enorme disposição em me ajudar e por ter se tornado meu amigo;

Ao Professor Dr. Ricardo Azevedo pelas várias colaborações e pela participação em minha qualificação;

Aos colegas e do Laboratório de Morfologia e Morfogênese pelas várias colaborações, em especial, Caroline, Érica, Graziella, João Paulo, Luciano, Sacha e Djalma;

À Profa Dra. Carolina Lucci, pelas importantes orientações em análise estatística;

Ao professor César Grisólia pela participação em minha qualificação;

Aos professores e colegas do Laboratório de Microbiologia, pela disponibilização da sala de cultura quando precisamos;

À Dona Ivanilde, Dona Fátima, Celso e Dona Conceição pelo cuidado com o nosso laboratório e por toda assistência. Às secretárias do nosso departamento, Ana e Sandra, pela atenção;

Aos meus grandes amigos de sempre, Ana Luiza, Camilla, Cynthia, Daniel, Fernanda, Fabrício, Juliana, Lívia, Luis Eduardo, Marcos Ruben, Rafael, Rommel, Tábata, Tatiana e Vanderlei;

Ao Tiago, pelas inúmeras vezes que solucionou meus problemas e dúvidas de computador e por ser um futuro cunhado muito querido;

Ao Ricardo por me ensinar com seu amor que podemos fazer juntos muito mais que imaginava, e com isso experimentar com maior intensidade a tão sublime realidade de ampliar minha vida na sua;

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Índice

	p.
Lista de termos e abreviaturas	viii
Índice de tabelas	x
Índice de figuras	xi
Resumo	xiii
<i>Abstract</i>	xiv
1. Introdução	1
1.1. Plantas tóxicas	2
1.2. A samambaia <i>Pteridium aquilinum</i>	3
1.2.1. A toxicidade de <i>P. aquilinum</i>	5
1.2.2. A carcinogenicidade de <i>P. aquilinum</i>	6
1.2.3. Compostos tóxicos, mutagênicos e/ou carcinogênicos encontrados em <i>P. aquilinum</i>	9
1.2.4. Mecanismo de ação da ptaquilosida	11
1.3. Morte celular	13
1.4. Testes de genotoxicidade e citotoxicidade	15
1.5. Linhagens celulares de cabeça e pescoço	16
1.5.1. HSG	17
1.5.2. OSCC-3	17
1.6. Objeto de estudo	18
2. Objetivos	19
3. Material e Métodos	21
3.1. Preparo do extrato aquoso não fracionado de <i>P. aquilinum</i>	22
3.2. Manutenção da cultura de células HSG e OSCC-3	22
3.3. Determinação do tempo de tratamento e das concentrações de extrato aquoso não fracionado de <i>P. aquilinum</i> a ser administrado às células HSG e OSCC-3	23
3.3.1. Análise estatística	24
3.4. Tratamento experimental das células HSG e OSCC-3	24
3.5. Avaliação dos danos no DNA por meio de eletroforese de células isoladas em microgel – “Ensaio Cometa”	25
3.5.1. Análise visual dos danos no DNA	26

3.5.1.1. Análise estatística	27
3.5.2. Análise dos danos no DNA por meio do programa CASP	27
3.5.2.1. Análise estatística	27
3.6. Análise de danos ao DNA de células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato de <i>P. aquilinum</i> por meio do ensaio de fragmentação do DNA - “DNA ladder”	28
3.7. Análise da morfologia das células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato aquoso não fracionado de <i>P. aquilinum</i>	29
3.7.1. Processamento das células HSG e OSCC-3 para análise da morfologia celular em microscopia de luz	29
3.7.2. Processamento das células HSG e OSCC-3 para análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de transmissão	30
3.8. Distinção entre as vias de degeneração apoptose e necrose das células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato aquoso não fracionado de <i>P. aquilinum</i> por meio do ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo	31
3.8.1. Critérios para classificação das células em apoptóticas, necróticas ou viáveis	31
3.8.2. Análise estatística	32
3.9. Detecção de apoptose nas células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato de <i>P. aquilinum</i> por meio do ensaio de TUNEL	32
3.9.1. Análise visual do ensaio de TUNEL	33
3.9.1.1. Análise estatística	34
3.9.2. Análise do ensaio de TUNEL por citometria de fluxo	34
3.9.2.1. Análise estatística	34
4. Resultados	35
4.1. Determinação do tempo de tratamento e das concentrações de extrato aquoso não fracionado de <i>P. aquilinum</i> a serem empregados nos testes com as células HSG e OSCC-3	36
4.2. Avaliação dos danos no DNA em células HSG e OSCC-3 tratadas extrato de <i>P. aquilinum</i> por meio do ensaio de eletroforese de células isoladas em microgel – “Ensaio Cometa”	38
4.2.1. Células HSG	38

4.2.2. Células OSCC-3	40
4.3. Análise de danos ao DNA de células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato de <i>P. aquilinum</i> por meio do ensaio de fragmentação do DNA - “DNA ladder”	42
4.4. Análise da morfologia das células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato aquoso não fracionado de <i>P. aquilinum</i>	43
4.4.1. Microscopia de luz	43
4.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão	47
4.5. Distinção entre as vias de degeneração das células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato aquoso não fracionado de <i>P. aquilinum</i> por meio do ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo	50
4.5.1- Células HSG	52
4.5.2. Células OSCC-3	53
4.6. Detecção de apoptose nas células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato de <i>P. aquilinum</i> por meio do ensaio de TUNEL	54
4.6.1. Células HSG	54
4.6.2. Células OSCC-3	55
5. Discussão	58
6. Conclusões	71
7. Perspectivas	73
8. Referências Bibliográficas	75

AIF	Fator indutor de apoptose
ANOVA	Análise de variância
Arcsen	Arco-seno
ATP	Adenosina trifosfato
BPV	Vírus do papiloma bovino
BrdUTP	5-bromo-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato
DMBA	Dimetil 1,2-benzantraceno
DMEM	<i>Dulbeco's Eagle Modified Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Endo G	Endonuclease G
FADD	Proteína com domínio de morte
FD	Frequência de células com dano no DNA
ID	Índice de dano
LMP	Baixo ponto de fusão
Log	Logaritmo na base 10
N1, N2, N3, N4	Número de cometas classificados nas classes 1, 2, 3 e 4, respectivamente
Pa	Extrato de <i>Pteridium aquilinum</i>
pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PTA	Ptaquilosida
RNA	Ácido ribonucléico
S	Número de cometas analisados

TdT	Deoxinucleotidil transferase terminal
TBT	Tributilina
TUNEL	Marcação de Terminações dUTP pela Deoxinucleotidil Transferase Terminal
ua	Unidade arbitrária

	p.
Tabela 01. Tratamentos administrados às células HSG e OSCC-3 para o teste de viabilidade celular na presença do extrato de <i>P. aquilinum</i>	23
Tabela 02. Grupos experimentais utilizados para avaliação dos efeitos do extrato aquoso não fracionado de <i>P. aquilinum</i> sobre células HSG e OSCC-3	24
Tabela 03. Número médio de células HSG viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes intervalos de tempo	36
Tabela 04. Número médio de células OSCC-3 viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes intervalos de tempo	37

	p.
Figura 01. Samambaia <i>Pteridium aquilinum</i>	3
Figura 02. Modelo de carcinogênese induzida pela samambaia <i>P. aquilinum</i>	12
Figura 03. Vias de ativação da apoptose.	14
Figura 04. Brotos de <i>P. aquilinum</i> utilizados neste estudo	22
Figura 05. Fotomicrografia de fluorescência de nucleóides de células HSG classificados em padrões preestabelecidos	26
Figura 06. Representação das janelas do programa <i>CASP</i>	28
Figura 07. Células HSG e OSCC-3 após o ensaio de TUNEL, observadas ao microscópio de fluorescência	33
Figura 08. Número médio de células HSG viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes intervalos de tempo	36
Figura 09. Número médio de células OSCC-3 viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes intervalos de tempo	37
Figura 10. Freqüência de células HSG com dano no DNA após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações	38
Figura 11. Índice de dano no DNA em células HSG após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações	39
Figura 12. Percentual de DNA fragmentado em células HSG após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações	40
Figura 13. Freqüência de células OSCC-3 com dano no DNA após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações	41
Figura 14. Índice de dano no DNA em células OSCC-3 após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações	41
Figura 15. Percentual de DNA fragmentado em células OSCC-3 após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações	42
Figura 16. Análise em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo do DNA total extraído de células HSG e OSCC-3 tratadas com diferentes concentrações do extrato de <i>P. aquilinum</i>	43

Figura 17.	Fotomicrografias de células HSG tratadas com o extrato de <i>P. aquilinum</i>	45
Figura 18.	Fotomicrografias de células OSCC-3 tratadas com o extrato de <i>P. aquilinum</i>	46
Figura 19.	Eletrmicrografia de transmissão de células HSG tratadas com o extrato de <i>P. aquilinum</i>	48
Figura 20.	Eletrmicrografia de transmissão de células OSCC-3 tratadas com o extrato de <i>P. aquilinum</i>	49
Figura 21.	Fotomicrografias de fluorescência de células HSG e OSCC-3 tratadas com o extrato de <i>P. aquilinum</i> e coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídeo	51
Figura 22.	Frequência de células HSG em degeneração após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações	52
Figura 23.	Frequência de células OSCC-3 em degeneração após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações	53
Figura 24.	Frequência de células HSG em apoptose após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações (dados obtidos por análise visual do ensaio de TUNEL).	54
Figura 25.	Frequência de células HSG em apoptose após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações (dados obtidos por citometria de fluxo, no ensaio de TUNEL).	55
Figura 26.	Frequência de células OSCC-3 em apoptose após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações (dados obtidos por análise visual do ensaio de TUNEL).	56
Figura 27.	Frequência de células OSCC-3 em apoptose após tratamento com o extrato de <i>P. aquilinum</i> em diferentes concentrações (dados obtidos por citometria de fluxo, no ensaio de TUNEL).	57

Apoptose induzida por extrato aquoso de *Pteridium aquilinum* em células de glândula submandibular humana (HSG) e de epitélio bucal (OSCC-3)

A samambaia *Pteridium aquilinum* é considerada uma das plantas tóxicas mais importantes, não só por sua extensa distribuição geográfica, mas também por provocar, nas diferentes espécies animais que a utilizam como alimento, severos quadros de intoxicação e o desenvolvimento de tumores nos trato digestório e urinário. Além disso, estudos epidemiológicos têm relacionado a alta incidência de câncer de esôfago e estômago em populações humanas à utilização da samambaia na alimentação e à exposição indireta aos seus carcinógenos, como pela aspiração de seus esporos e pela ingestão de leite de vacas que se alimentaram da planta ou de água contaminada por tais compostos. Para melhor entender dos mecanismos de toxicidade induzida por essa samambaia, este estudo avaliou os efeitos genotóxicos e citotóxicos do extrato aquoso da planta, em três diferentes concentrações (0,20; 0,40 e 0,67 mg/mL), sobre células de glândula submandibular humana (HSG) e de epitélio bucal (OSCC-3). O ensaio de cometa mostrou que o extrato foi genotóxico para ambas linhagens celulares, nas diferentes concentrações estudadas, mas não de forma dose-dependente. O experimento de *DNA ladder*, por outro lado, não demonstrou fragmentação incomum da cromatina, provavelmente em função de uma baixa percentagem de células com material genético severamente alterado, em comparação àquelas pouco afetadas. As análises morfológica, por microscopia de luz, e ultraestrutural, por microscopia eletrônica de transmissão, permitiram observar que o extrato de *P. aquilinum* provocou alterações evidentes em ambos tipos celulares, como condensações atípicas na cromatina, picnose nuclear, diminuição no volume das células, ruptura do envoltório nuclear, presença de numerosos vacúolos de tamanhos variados e a formação de corpos apoptóticos. Esses resultados, em conjunto com os obtidos com os ensaios de coloração com alaranjado de acridina/brometo de etídeo e de TUNEL, evidenciaram que extrato foi citotóxico para as células HSG e OSCC-3, em todas as concentrações estudadas, e que a principal via de degeneração celular induzida foi a apoptose.

Apoptosis induced by aqueous extract of *Pteridium aquilinum* in human submandibular gland cells (HSG) and human buccal epithelium cells (OSCC-3)

The bracken *Pteridium aquilinum* is considered one of the most important toxic plants, not only for its extensive geographic distribution, but also for provoking, in different animal species that use it as food, severe poisoning and the development of tumors in the digestory and urinary tracts. Moreover, epidemiologic studies have related the high incidence of esophagus and stomach cancers in human populations to the use of the bracken as food. This incidence may also be related to the indirect exposition to bracken carcinogens, as by the aspiration of its spores, the ingestion of milk from cows feeding on the plant, or by the consumption of water contaminated by such composites. Aiming to better understand the toxicity mechanisms induced by bracken fern, this study evaluated the genotoxic and cytotoxic effects of the plant aqueous extract, at three different concentrations (0.20, 0.40 and 0.67 mg/mL), over human submandibular gland (HSG) and buccal epithelium (OSCC-3) cells. The comet assay showed that the extract was genotoxic for both cell lines, at the different studied concentrations, but the results were not dose-dependent. *DNA ladder* assay, on the other hand, did not show an unusual DNA fragmentation pattern, possibly due to the low percentage of severely damaged cells. The morphological (light microscopy) and ultrastructural (transmission electron microscopy) analyses showed that the extract provoked conspicuous alterations in both cell types, such as cromatin uncommon condensation, nuclear picnosis, cellular volume decrease, nuclear envelope rupture, the presence of numerous vacuoles of different sizes and the formation of apoptotic bodies. This results, added to those obtained with the acridine orange/ethidium bromide fluorescent dyeing test and in the TUNEL assay, clearly demonstrated that the bracken extract was cytotoxic to HSG and OSCC-3 cells, at all the studied concentrations, and that cellular degeneration occurred mainly by apoptosis.

1. Introdução

1.1 - Plantas tóxicas

Estima-se que mais de 99% de todas as substâncias tóxicas a que o homem está exposto são de origem natural (Ames & Gold, 1990). Entre 1966 e 1994, de todas as intoxicações sofridas por homens ou animais registradas no Centro Suíço de Informação Toxicológica, 7,2% foram causadas por plantas, o que corresponde a 24950 casos de contato com plantas tóxicas ou sua ingestão (Jaspersen-Schib *et al.*, 1996 citados em Kawohl & Habermeyer, 2005).

No Brasil, o envenenamento por plantas, juntamente com a raiva e o botulismo, são as principais causas de morte do gado adulto. Estimativas indicam que, anualmente em nosso país, aproximadamente um milhão de cabeças de gado morrem por envenenamento por plantas (Tokarnia *et al.*, 2002).

Pesquisas realizadas no estado do Rio Grande do Sul no período entre 1978 e 1998, verificaram que 10,6 a 14% dos bovinos cuja causa da morte foi investigada morreram por envenenamento por plantas. Considerando que nesse estado há 13 milhões de cabeças de gado, e que a taxa anual de mortalidade é de 5 %, o envenenamento por plantas corresponde a um número de mortes entre 65000 a 90000. No estado de Santa Catarina, estudos mostraram que as mortes de bovinos por plantas tóxicas, em um período de 12 anos, representam 13,9% do total de mortes, com variação anual de 8,5% a 24,3%. Por ano, a média de mortes de bovinos por intoxicação por plantas é estimada em 20574 cabeças (revisto por Tokarnia *et al.*, 2002). Outro estudo epidemiológico realizado no estado de Santa Catarina revisou diagnósticos de necropsia de gado bovino no período entre 1987 e 2001. De 3407 necropsias realizadas, 572 (17%) indicaram que a causa da morte foi a intoxicação por plantas tóxicas (Gava *et al.*, 2002). A projeção desses dados para toda a população de bovinos do Brasil (160 milhões de cabeças de gado) indica que, anualmente, morrem entre 800000 e 1120000 animais por ingestão de plantas tóxicas. Os valores reais são provavelmente mais elevados que esses, porque as regiões Sul e Sudeste apresentam as menores taxas de mortalidade de gado do País. Taxas mais elevadas ocorrem nas regiões Norte, seguida pelas regiões Nordeste e Centro-Oeste (revisto por Tokarnia *et al.*, 2002).

Rebanhos de ovinos também sofrem significativas perdas por ingestão de plantas tóxicas. No Rio Grande do Sul, a taxa de mortalidade anual de ovinos é de 15 a 20%, sendo que, destes, 7,2% ocorrem por intoxicação por plantas, correspondendo a 54000 a 72000 animais (Riet-Correa & Medeiros, 2001).

No Brasil, o número de plantas conhecidas como tóxicas aumenta constantemente, sendo atualmente descritas pelo menos 88 espécies pertencentes a 50 gêneros (Riet-Correa & Medeiros, 2001). Tokarnia *et al.* (2002) classificaram as espécies de plantas tóxicas

encontradas no Brasil de acordo com o quadro clínico-patológico de intoxicação que induzem: plantas hepatotóxicas, nefrotóxicas, cianogênicas, cardiotoxícas, gastrotóxicas, neurotóxicas, que afetam a reprodução, que afetam a pele e anexos, que causam degeneração e necrose muscular, que causam fotossensibilidade, que causam calcinose, que causam envenenamento por ou por nitrato / nitrito, que causam anemia hemolítica e que apresentam ação radiomimética.

Apesar do grande número de espécies de plantas tóxicas descritas, as identificadas como causadoras de perdas econômicas importantes são relativamente poucas (Riet-Correa & Medeiros, 2001).

1.2 - A samambaia *Pteridium aquilinum*

Entre as inúmeras espécies de plantas tóxicas descritas, *Pteridium aquilinum* (Figura 01) é uma das mais importantes e vem sendo muito estudada por sua elevada toxicidade e seu potencial carcinogênico (Tokarnia *et al.*, 2002).



Figura 01. Samambaia *Pteridium aquilinum* (A). (B) Broto da planta em destaque.

Fonte: www.chipr.sunysb.edu e www.swcoloradowildflowers.com

Também chamada *Pteris aquilina*, essa planta é vulgarmente conhecida como “samambaia das taperas”, “samambaia brava” e “samambaia dos campos”. Pertence à família das *Polypodiaceae*, na qual se reconhecem 200 gêneros e 5000 espécies (Gerenutti *et al.*, 1992a). É uma planta cosmopolita, presente em todas as regiões do planeta, exceto em áreas polares e desérticas, predominando em regiões tropicais e subtropicais (Ribeiro *et al.*, 1995). Foi descrita como uma das cinco plantas mais comuns no planeta, sendo a mais localmente intensiva e globalmente extensiva de todas as plantas vasculares (Shahin *et al.*, 1999). No Brasil, ocorre principalmente em áreas montanhosas do nordeste, sudeste e sul, mas também

em áreas restritas das demais regiões (Tokarnia *et al.*, 2002). Como é muito pouco exigente quanto à qualidade do solo, sobrevive bem em solos ácidos, arenosos e pobres em nutrientes. É considerada uma planta invasora, surgindo com muito vigor em terrenos queimados e devastados, pastagens, campos e matas ciliares. A constante destruição de florestas e o abandono de regiões propícias à agricultura são os principais fatores de propagação da planta (Ribeiro *et al.*, 1995). A propagação e a multiplicação vegetativa ocorrem durante o ano todo, porém com maior intensidade nas estações chuvosas (Gerenutti *et al.*, 1992a).

Segundo Rasmussen (2003), existem relatos da utilização da *P. aquilinum* para forrar leite de animais, cobertura de cabanas, confecção de cestas e embrulhos para frutas e materiais quebráveis, agente alvejante para lã, fonte de carbonato de potássio para indústria de vidro e de sabão, agente acidificante do solo, além de ser uma planta ornamental e utilizada em rituais religiosos. No entanto, sua forma de utilização mais preocupante é como alimento.

A samambaia é frequentemente utilizada como alimento por diversos animais (bovinos, suínos, eqüinos, ovinos, etc.), em épocas de escassez de alimento, especialmente quando as pastagens são desmatadas ou queimadas. Comumente também é ingerida como contaminante de forragens. Há relatos de que muitos animais tornam-se dependentes da planta, procurando-a mesmo depois de cessada a fome. Acredita-se também que o gado que não recebe suficiente material fibroso acostuma-se a ingerir a samambaia para suprir essa deficiência (Gerenutti *et al.*, 1992a; Tokarnia *et al.*, 2002).

Muitos povos utilizam o rizoma, as folhas jovens e os brotos de *P. aquilinum* como alimento, preparados na forma de cozidos, como salada verde ou chá. Entre os países cujos povos utilizam a planta como alimento, destacam-se os Estados Unidos, o Brasil, o Canadá, a China, a Rússia, a Nova Zelândia, a Coreia e, principalmente, o Japão (Gerenutti *et al.*, 1992a; França *et al.*, 2002). Estimou-se que, só em Tóquio, são consumidos anualmente 300 toneladas de broto de samambaia (Ribeiro *et al.*, 1995). Na primavera é um dos pratos favoritos dos japoneses, que acreditam que a planta seja muito benéfica para a saúde (Sugimura, 2000). No Brasil, Santos (1990) relatou o consumo dos brotos da samambaia nos estados de Minas Gerais e São Paulo, sendo neste último o consumo atribuído ao grande número de habitantes descendentes de orientais. Relata-se ainda sua aplicação medicinal, que inclui o emprego na preparação de vermífugo, abortivo e regulador para o sistema digestório, além de ser utilizada na indústria de cerveja. (Rasmussen, 2003).

1.2.1 - A toxicidade de *P. aquilinum*

Os registros do reconhecimento da toxidez da samambaia *P. aquilinum* datam desde o final do século XIX, mas publicações mais embasadas sobre a toxicidade dessa planta para animais de fazenda só começaram a surgir em meados da década de 40, do século XX (revisto por França *et al.*, 2002).

Nos primeiros relatos, só se reconhecia o princípio tiaminolítico. Em 1946, Weswig *et al.* (citados em França *et al.*, 2002) induziram polineurite em ratos por meio da administração de dietas contendo 40% de *P. aquilinum*. Sabe-se que a samambaia contém tiaminase, presente principalmente nos rizomas e nos brotos. Essa enzima cliva a molécula de tiamina, inativando-a (Hirono, 1985). O consumo da planta pode levar, por conseguinte, à deficiência de tiamina (vitamina B1), também conhecida com beribéri (Rasmussen, 2003). Essa deficiência provoca um quadro de toxicidade principalmente em animais não ruminantes, que são incapazes de sintetizar a vitamina. Essa carência vitamínica, quando apresentada por eqüinos e asininos, causa anorexia e sintomas de ordem neuromuscular, como falta de coordenação motora, posturas anormais dos membros, tremores musculares, convulsão e sonolência (revisto por Gerenutti *et al.*, 1992a). A indução da deficiência de vitamina B1 por *P. aquilinum* foi também demonstrada experimentalmente, sendo responsável pelo aparecimento de lesões nervosas típicas em ratos, como descreve Hirono (1985).

Em 1967, Döbereiner *et al.* relataram a ocorrência de três quadros clínicos freqüentes em bovinos de regiões brasileiras onde a samambaia infestava as pastagens: a) hematuria enzoótica crônica (perda intermitente de sangue pela urina), em animais a partir de dois anos de idade; b) ronqueira e a dificuldade de deglutição; c) regurgitação dos alimentos e timpanismo crônico (acúmulo de gás no rúmen, também chamado de meteorismo), observado em animais de cinco anos em diante. Esses quadros clínicos levavam a um progressivo emagrecimento e óbito dos animais.

Döbereiner *et al.* (1967) citam outros autores que também relatam a intoxicação por samambaia no Brasil, como, por exemplo, um estudo realizado em São Paulo, em 1966, em que bovinos apresentavam hematuria, aspecto físico geral precário e acentuada baixa de granulócitos e plaquetas. Jarrett *et al.* (1978) também observaram esses fenômenos em gado britânico, como conseqüências de uma ingestão de grande quantidade de samambaia. Apesar de os sintomas se desenvolverem lentamente, com os primeiros sinais aparecendo várias semanas depois do começo da ingestão, a evolução do quadro de intoxicação por samambaia é dramático e quase sempre fatal, com a morte ocorrendo poucas semanas após o aparecimento dos sintomas (Hirono, 1985).

P. aquilinum tem sido reconhecida como a única planta com atividade radiomimética, por conter toxinas cujas alterações induzidas reproduzem muitos dos efeitos produzidos pela radiação X (Tokarnia *et al.*, 2002). Seu radiomimetismo está associado à hematúria enzoótica, já que essa doença está relacionada a uma depressão da medula óssea (Dawra *et al.*, 1988). Analogamente aos efeitos da radiação, o quadro clínico apresentado pelos animais intoxicados pela samambaia inclui aplasia da medula óssea, leucopenia, agranulocitose, trombocitopenia, fragilidade capilar, alteração da coagulação sanguínea, indução de mutações e esterilidade (Evans, 1968; Shahin *et al.*, 1999). Devido à leucopenia, os animais tomam-se mais suscetíveis a infecções bacterianas e à septicemia (França *et al.*, 2002).

Dawra *et al.* (1988), ao estudarem alterações na membrana de eritrócitos de bovinos com hematúria enzoótica, cuja causa foi atribuída ao consumo de *P. aquilinum*, mostraram, nos animais afetados, uma significativa diminuição da atividade de ATPases de membrana.

Outra enfermidade causada pelo consumo da samambaia e que também já foi reproduzida experimentalmente é a cegueira brilhante, que acomete ambos olhos e é permanente. Sua denominação provém do aumento da reflexão do olho. A doença, que acomete principalmente ovinos, mas é também detectada em bovinos, caracteriza-se por uma degeneração progressiva do neuroepitélio da retina, provocando uma cegueira bilateral permanente (França *et al.*, 2002; Rasmussen, 2003;).

Outros efeitos da ingestão de *P. aquilinum* foram verificados em relação à fertilidade de ratas e ao desenvolvimento de sua prole. Gerenutti *et al.* (1992b) alimentaram ratas com uma dieta contendo 30% da planta e observaram diminuição na fertilidade e redução do ganho de peso durante a gestação. Verificaram também alguns efeitos adversos no desenvolvimento físico e neurocomportamental dos filhotes.

Alguns trabalhos demonstraram que os sintomas clínicos da intoxicação por *P. aquilinum* também eram acompanhados por danos genéticos. Walter-Moura *et al.* (1988), estudando bovinos que se alimentaram de pastagens que continham essa samambaia, observaram que os animais apresentavam uma frequência aumentada de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico, quando comparados a animais que permaneceram em pastos nos quais não se detectou a presença da planta. Verificaram também que a frequência de alterações genéticas estava relacionada ao tempo de exposição à samambaia.

1.2.2 - A carcinogenicidade de *P. aquilinum*

P. aquilinum tem sido relatada como a única planta vascular conhecida que causa câncer naturalmente em animais (Shahin *et al.*, 1999). As primeiras evidências da

carcinogenicidade da samambaia foram reportadas por Rosemberger e Heeschen (1960, citados em Gerenutti *et al.*, 1992a), que descreveram alterações na forma de pólipos na mucosa da bexiga urinária, acompanhados de hematúria em bovinos que ingeriram essa planta por longos períodos.

Muitos trabalhos subseqüentes também descreveram a ocorrência de carcinomas associados ao consumo da samambaia. Döbereiner *et al.* (1967) associaram a ocorrência de hematúria intermitente crônica em bovinos à presença de lesões neoplásicas malignas no sistema urinário. A ronqueira e a dificuldade de deglutição foram associadas à presença de carcinomas na faringe e o regurgitamento de alimentos e o timpanismo foram relacionados à presença de carcinomas no esôfago.

Em 1978, Jarrett *et al.* observaram que, em áreas de topografia elevada na Escócia e no norte da Inglaterra, onde a samambaia *P. aquilinum* era mais freqüente, havia uma alta incidência de cânceres do trato digestório em bovinos de corte, enquanto que nas regiões vizinhas mais baixas, a doença era praticamente inexistente. Os autores sugeriram uma relação entre a ocorrência das neoplasias e algum carcinógeno presente na samambaia.

Conforme revisto por França *et al.* (2002), o efeito carcinogênico de *P. aquilinum* pode variar em função da espécie animal que a consome. Enquanto bovinos desenvolvem câncer no trato digestório superior e na bexiga, ovinos costumam apresentar tumores malignos intestinais.

As crescentes evidências da relação entre a ingestão de samambaia e o aparecimento de neoplasias motivaram uma série de experimentos com a finalidade de reproduzir, em várias espécies animais de laboratório, os mesmos efeitos quando em condições naturais de exposição. Evans e Mason (1965) foram os primeiros a demonstrar experimentalmente a carcinogenicidade de *P. aquilinum*, mostrando que ratos alimentados com dieta contendo o broto da samambaia desenvolveram múltiplos adenocarcinomas no intestino delgado. Mostraram também que a idade é um fator que contribui para a suscetibilidade a esse câncer, já que somente ratos com idade de sete semanas desenvolveram os tumores, o que não se observou naqueles de 13 a 18 meses.

Posteriormente, Pamukcu e Price (1969) induziram carcinomas em bexigas de camundongos nas quais foram implantados comprimidos de colesterol contendo a fração ácida da urina de bovinos alimentados com a samambaia. Sumi *et al.* (1981) demonstraram que não havia diferença significativa entre a incidência de tumores intestinais entre ratos livres de germes e ratos convencionais alimentados com dieta contendo samambaia, sugerindo que a microbiota intestinal não influencia significativamente a tumorigênese induzida pela planta. Hirono *et al.* (1970) reportaram que a samambaia de forma natural ou cozida,

conforme é usualmente consumida por humanos no Japão, induz a formação neoplasias malignas no íleo e na bexiga de ratos.

No Brasil, o potencial carcinogênico de espécimes de samambaia coletadas em Ouro Preto também foi demonstrado por Santos *et al.*, em 1987, quando todos os ratos alimentados por mais de 70 semanas com uma dieta contendo 5% dessa planta desenvolveram tumores no trato gastrointestinal, sendo a maioria desses de natureza maligna. A carcinogenicidade de *P. aquilinum* foi ainda demonstrada experimentalmente em outras espécies além de ratos, como camundongos, cobaias, hamsters, bovinos e ovinos. (revisto por Hirono, 1985; França *et al.*, 2002),

Muitos trabalhos têm sugerido que o vírus do papiloma bovino tipo 4 (BPV-4) é responsável, em associação com o consumo de *P. aquilinum*, pelo aparecimento de carcinomas no trato digestório superior em bovinos (Campo *et al.*, 1980; Jarrett, 1987). Por outro lado, o vírus do papiloma bovino tipo 2 (BPV-2) tem sido associado aos carcinomas de bexiga (Campo *et al.*, 1990). Estudos mais recentes mostraram, em bovinos tratados com carcinógenos da samambaia, a ativação do gene *H-ras* em carcinomas do trato digestório superior associados ao vírus do papiloma (Shahin *et al.*, 1998).

Estudos epidemiológicos relacionam a exposição à samambaia ao risco de desenvolvimento de câncer no trato digestório superior em humanos, principalmente no Japão e no Brasil (Alonso-Amelot & Avedaño, 2002; Freitas *et al.*, 2002). Há também indicações de uma possível associação entre a exposição à planta e a alta incidência de câncer de bexiga em humanos na Irlanda (revisto por França *et al.*, 2002). Rasmussen (2003) ressalta que uma alta incidência dessas neoplasias (entre 2,1 e 8,1 vezes mais freqüente) ocorre não apenas em populações que se alimentam da samambaia, mas também naquelas que, apesar de não consumirem a planta, são expostas a ela de alguma forma, por um período considerável de tempo. Em regiões rurais do País de Gales, por exemplo, Galpin *et al.*, (1990) verificaram que pessoas que viveram em fazendas durante a infância e tiveram contato com a planta, embora não a ingerissem, tinham maior risco de desenvolvimento de câncer gástrico.

Simán *et al.* (2000) afirmam que o risco de desenvolver câncer causado pela samambaia pode ser diminuído evitando-se a ingestão da planta, mas não pode ser eliminado, porque há outras formas de contato com seus carcinógenos que podem ocorrer de maneira involuntária. Outros autores propuseram diferentes vias por meio das quais poderia estar acontecendo a exposição de populações humanas aos carcinógenos de *P. aquilinum*, como, por exemplo, o consumo do leite de vacas alimentadas com a planta.

Nesse sentido, estudos epidemiológicos foram realizados e mostraram que, onde a

samambaia é endêmica, como em regiões de altitude elevada da Costa Rica e da Venezuela, a população, mesmo sem ingerir a planta, apresenta maior incidência de câncer de esôfago e de estômago, respectivamente, quando comparada à população das regiões baixas, onde a samambaia é mais rara (Villalobos-Salazar *et al.*, 1989; Alonso-Amelot & Avedaño, 2001). Os autores sugerem que isso ocorre devido ao consumo do leite proveniente de animais que ingeriram samambaia. Villalobos-Salazar *et al.* (1989) verificaram, de fato, que camundongos alimentados com o leite de vacas que consumiam a planta apresentaram maior frequência de lesões benignas e malignas. Assim, Alonso-Amelot *et al.* (1996), quando realizaram um estudo na Venezuela, detectaram, no leite de vacas que ingeriram a planta, a presença de um composto mutagênico da samambaia em uma concentração correspondente a aproximadamente 8,6% da quantidade da planta ingerida pelas vacas. Recentemente, também foi detectada a presença de dois compostos da samambaia considerados genotóxicos no soro, na urina e no leite de vacas com hematúria enzoótica crônica (Lioi *et al.*, 2004).

Rasmussen *et al.* (2003a) estudando a composição de solos e subsolos dinamarqueses, constataram que, em regiões infestadas pela samambaia, havia uma alta concentração de um carcinógeno da planta. Tal composto pode ser transferido para o solo a partir de material da planta em decomposição ou pela urina de animais que estiverem pastando no local. Entretanto, conforme resultados obtidos por Rasmussen *et al.* (2003b), a principal forma de contaminação do solo com esse carcinógeno ocorre por processos de lixiviação. Pode-se supor, por conseguinte, que tais contaminantes do solo atinjam aquíferos e reservatórios hídricos de superfície, criando uma nova fonte de exposição: a água.

Além dos relatos de exposição involuntária aos carcinógenos de *P. aquilinum* por meio da ingestão de leite ou água contaminados, um estudo realizado por Simán *et al.* (2000) mostrou que células em cultura tratadas com esporos da planta apresentaram quebra no DNA. Esses resultados sugerem que substâncias carcinogênicas da planta podem ser transmitidas também por meio da inalação de seus esporos.

1.2.3 - Compostos tóxicos, mutagênicos e/ou carcinogênicos encontrados em *P. aquilinum*

Sabe-se que todas as partes da samambaia *P. aquilinum* são tóxicas, especialmente os rizomas. Dentre as partes aéreas, o broto tem se mostrado o mais tóxico. Além disso, mesmo dessecada, a planta guarda sua toxidez (Gerenutti *et al.*, 1992a). Tem-se relatado também que o processamento da samambaia, da forma como é preparada para ser usada na alimentação humana, diminui mas não elimina seu potencial tóxico (Sugimura, 2000).

Desde que se comprovou a relação entre a ingestão da planta e seus efeitos nocivos à saúde, muitos estudos têm sido feitos para identificar, entre as substâncias naturalmente presentes na planta, qual ou quais seriam seus princípios ativos, responsáveis por sua toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. Extratos da planta preparados com diferentes solventes e processados em diferentes condições experimentais foram testados em ensaios com animais. A partir desses experimentos, conseguiu-se identificar e isolar um composto presente nos extratos que se mostraram tóxicos e/ou carcinogênicos: a ptaquilosida (Niwa *et al.*, 1983; Hirono *et al.*, 1984a).

A ptaquilosida (PTA), também conhecida como aquilídeo A, é um norsesquiterpeno, glicosídeo intermediário da biossíntese de pterosídeos. Foi considerada por diversos autores como a principal responsável pelos efeitos tóxicos e carcinogênicos induzidos pela samambaia. Observou-se também que as diferenças de toxidez encontradas entre as diferentes partes da planta deviam-se a diferentes concentrações deste composto em cada uma delas Rasmussen (2003).

O potencial carcinogênico da ptaquilosida foi comprovado por muitos trabalhos. Hirono *et al.* (1984b) realizaram um estudo em ratos no qual administraram doses de ptaquilosida por via intragástrica, uma ou duas vezes por semana. Alguns animais, porém, receberam uma dose aguda bem maior no início do tratamento. Observou-se que os animais que receberam a dose mais alta apresentaram hematúria severa, incontinência urinária, perda de peso, câncer de mama e, em alguns casos, de intestino. Também apresentaram câncer de mama e de intestino 91% dos demais ratos, que receberam doses mais baixas do composto, embora não tenham apresentado os outros sinais verificados no primeiro grupo. Posteriormente, Hirono *et al.* (1987) demonstraram que todos os ratos alimentados com uma dieta contendo esse composto desenvolveram tumores malignos na bexiga e no íleo.

Além de carcinogênica, a ptaquilosida também tem sido descrita como um agente mutagênico (Matoba *et al.*, 1987; Nagao *et al.*, 1989; Prakash *et al.*, 1996; Potter & Baird, 2000). A PTA, administrada intravenosamente, se liga ao DNA em células do íleo de ratos e leva à formação de carcinomas de mama (Shahin *et al.*, 1998). Da mesma forma, o DNA extraído de ratos e tratado, *in vitro*, com PTA também apresentou essas associações. Essas, entretanto, são diferentes das causadas pelo extrato ou pelos esporos de samambaia em ratos tratados *in vivo* (Freitas, 2001). Esse fato sugere que o metabolismo da planta produz outras genotoxinas além da ptaquilosida, ou corrobora a idéia de que a samambaia apresente outros agentes genotóxicos como, por exemplo, a quercetina (Walter-Moura *et al.*, 1988).

Outro carcinógeno importante composto genotóxico encontrado na samambaia é o flavonóide quercetina. Seu potencial mutagênico tem sido relatado por diversos autores (Fazal *et al.*, 1990, Suzuki *et al.*, 1991, Connolly *et al.*, 1998; Beniston & Saveria Campo, 2003). Ela liga-se ao DNA, causando quebras de fita simples, rearranjos, troca de cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e parada na fase G1 do ciclo celular em células com proliferação normal. Além disso, tem-se relatado que ela interfere nos processos de sinalização intracelular de numerosas quinases. Pamukcu *et al.* (1980) sugeriram que ela teria efeito carcinogênico em ratos, mas esse potencial não foi confirmado por outros autores (Hirono *et al.*, 1981; Morino *et al.*, 1982; Hirose *et al.*, 1983; Stoewsand *et al.*, 1984; Ito *et al.*, 1989). O que se tem comprovado é o sinergismo existente entre o vírus do papiloma bovino tipo 4 (BPV-4) e a quercetina na transformação oncogênica de células *in vitro*. A quercetina provavelmente atua como um iniciador na conversão de fibroblastos bovinos infectados pelo BPV-4 para um fenótipo maligno, quando o gene *ras* está ativado (Pennie & Saveria Campo, 1992). Esses autores mostraram que os fibroblastos bovinos infectados pelo BPV-4, quando injetados em camundongos da linhagem *nude*, induziram, em quatro semanas, o desenvolvimento de câncer. Contudo Rietjens *et al.* (2005) questionam o envolvimento direto da quercetina na indução de câncer uma vez que os complexos formados entre ela e o DNA são transientes.

Nesse sentido, os efeitos da quercetina têm-se mostrado antagônicos. Se por um lado alguns trabalhos demonstram seu potencial genotóxico e sinergista na carcinogênese, outros demonstram suas propriedades antioxidantes (Saryanarayana *et al.*, 2001), sua ação protetora contra danos no DNA produzidos pelo benzopireno (Wargovich *et al.*, 1985) e seu papel na prevenção de mutações oxidativas (Grey & Adlercreutz, 2003). Balasubramanian e Govindasamy (1996) investigaram o efeito da quercetina adicionada à dieta de hamsters que receberam tratamento com o carcinógeno DMBA (dimetil 1,2-benzantraceno) e observaram que o flavonóide foi responsável pela diminuição na incidência de papilomas e tumores malignos de boca.

1.2.4 - Mecanismo de ação da ptaquilosida

Considerando as evidências que comprovam o potencial mutagênico, clastogênico e carcinogênico da ptaquilosida, muitos estudos têm sido feitos com esse composto no sentido de elucidar o mecanismo de toxicidade e indução de câncer pela samambaia *P. aquilinum*.

Em condições de pH neutro, a ptaquilosida não se mostra tóxica. Sua ativação ocorre sob condições alcalinas, quando é transformado em uma dienona instável e muito reativa. Segundo Rasmussen (2003), o pH alcalino no qual ocorre a ativação da ptaquilosida pode

explicar a localização dos tumores em bovinos, já que os intervalos de pH normalmente encontrados na saliva e na urina são, respectivamente, 8,1-8,2 e 7,5-8,5.

Shahin *et al.* (1999) propuseram um modelo de carcinogênese induzida pela samambaia (Figura 02). A PTA ativada cliva o DNA ligando-se a ele no nitrogênio 3 da adenina e no nitrogênio 7 da guanina. Esse potencial alquilante, associado à sua alta absorção biológica e mobilidade (por causa de sua parte glicosídica), são determinantes de sua toxicidade e carcinogenicidade (Prakash *et al.*, 1996).

Segundo o processo descrito no modelo, as células afetadas têm a capacidade de reparar o dano causado em um curto período de tempo. Alguns casos sofrem um erro no reparo, o que resulta em mutações em genes que regulam o ciclo celular, podendo iniciar-se a carcinogênese (Shahin *et al.*, 1999). Em conformidade com o modelo descrito, muito antes de que se pudessem identificar sinais de uma neoplasia, foram observadas mutações no oncogene *H-ras* de 60% dos ratos tratados com PTA por 10 semanas (Shahin *et al.*, 1998).

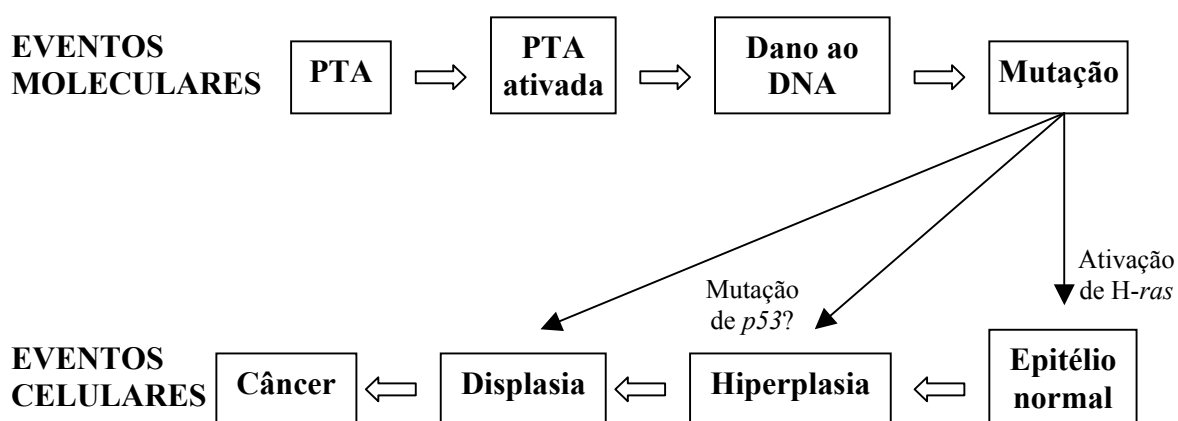


Figura 02. Modelo de carcinogênese induzida pela samambaia *P. aquilinum*. PTA = ptaquilosida. Adaptado de Shahin *et al.* (1999).

Conforme revisto por Rich *et al.* (2000), a estratégia das células eucarióticas para lidar com o dano ao DNA pode ser subdividida em três componentes: i) o reconhecimento do DNA lesado; ii) um período para avaliação do dano, facilitado pelos pontos de checagem do ciclo celular e iii) a implementação de uma resposta apropriada: reparo do DNA ou morte celular. Esses procedimentos não são ativados de maneira simples e linear, porque o reconhecimento do dano gera múltiplos sinais sincrônicos que podem disparar tanto o reparo como a morte. Nesse contexto, os pontos de checagem exercem um papel fundamental no sistema de resposta ao dano, por proporcionarem a oportunidade de avaliar a conveniência de cada um dos caminhos. Quando o dano ao DNA é excessivo, superando a capacidade de reparo da

célula, inicia-se um processo de degeneração. A morte da célula é induzida de forma a prevenir a expansão clonal que perpetuaria mutações ou poderia conduzir à carcinogênese (revisto por Bernstein *et al.*, 2002).

1.3 - Morte celular

Muitos termos já foram empregados para definir morte celular. Entre eles, destacam-se dois: necrose e apoptose. A palavra necrose vem do grego “*nekrósis*” (morte) e surgiu na Grécia antiga para significar um estágio avançado de degeneração em nível macroscópico. Desde então, vem sendo empregada como um termo geral para o estágio terminal da morte celular, sem que se definisse morfologicamente. A necrose tem sido relatada como uma forma passiva e traumática de morte celular, geralmente iniciada pela destruição da membrana plasmática ou pela perda de sua integridade bioquímica, levando ao intumescimento da célula e liberação das organelas em degradação para o meio extracelular. Quando o processo ocorre *in vivo*, desencadeia-se um processo inflamatório (revisto por Renvoisé *et al.*, 1998 e por Willingham, 1999).

Em 1972, Kerr propôs o conceito de apoptose com base em uma série de alterações ultraestruturais. O termo apoptose é uma combinação dos termos gregos “*apó*” (separação) e “*ptósis*” (queda), relacionando a imagem de “folhas caindo” à formação dos corpos apoptóticos (revisto por Otsuki *et al.*, 2003). A apoptose é definida como um processo ativo, disparado por sinais extra ou intracelulares, sendo caracterizada por uma cascata de eventos morfológicos e bioquímicos bem definidos. Em sua fase inicial, ocorre condensação da cromatina, formando agregados localizados principalmente na periferia do núcleo. O DNA fragmenta-se em regiões internucleossomais e as células liberam ativamente o fluido citoplasmático, provocando a redução no seu volume. A membrana plasmática adquire os chamados corpos apoptóticos, que são projeções da membrana plasmática contendo organelas e/ou cromatina. Com a eliminação do conteúdo celular por meio da liberação desses corpos, haverá desintegração da célula (revisto por Wyllie, 1992). Embora sejam processos que ocorrem por mecanismos moleculares a princípio muito distintos, alguns trabalhos relatam que a apoptose ou a necrose ocorrerão segundo o balanço energético da célula ou a concentração intracelular de trifosfato de adenosina (ATP). É ainda possível que representem a execução completa (apoptose) ou parcial (necrose) de um programa interno de morte (Leist & Nicotera, 1997). Outros autores discutem que a intensidade do dano provocado na célula é determinante na escolha da via de morte, sendo que danos mais intensos levariam à necrose (Orrenius, 2004).

A apoptose ocorre principalmente por meio de duas vias (Figura 03). A primeira, chamada via extrínseca ou citoplasmática, é disparada por receptores de morte localizados na superfície celular. A segunda é conhecida como via intrínseca ou mitocondrial, que, quando estimulada, leva à liberação do citocromo c da mitocôndria e ativação do sinal de morte. Ambas vias convergem para um final em comum, que envolve a ativação da cascata de proteases chamadas caspases, que clivam moléculas regulatórias e estruturais, culminando na morte da célula.

A via extrínseca é ativada com a ligação moléculas sinalizadoras de morte aos receptores de membrana da família de receptores de fator de necrose tumoral, como o Fas (também conhecido como Apo-1 ou CD95), TNF R1, DR3 (Apo 2), DR4, DR5 e DR6. A interação dos ligantes (FasL) aos complexos inativos Fas leva à formação do complexo sinalizador de morte, que contém a proteína com domínio de morte (FADD) associada a Fas e a caspase 8. A ativação da caspase 8 leva à ativação da seqüência de caspases efetoras, iniciando pela caspase 3. Há vários fatores regulatórios dessa via, que incluem o NFκB, a proteína ativadora 1 (ativa a transcrição do gene de FasL), os inibidores FAP-1 e outros receptores que antagonizam a estimulação de Fas por competição na ligação do FasL (Kaufmann & Hengartner, 2001; revisto por Ghobrial *et al.*, 2005 e).

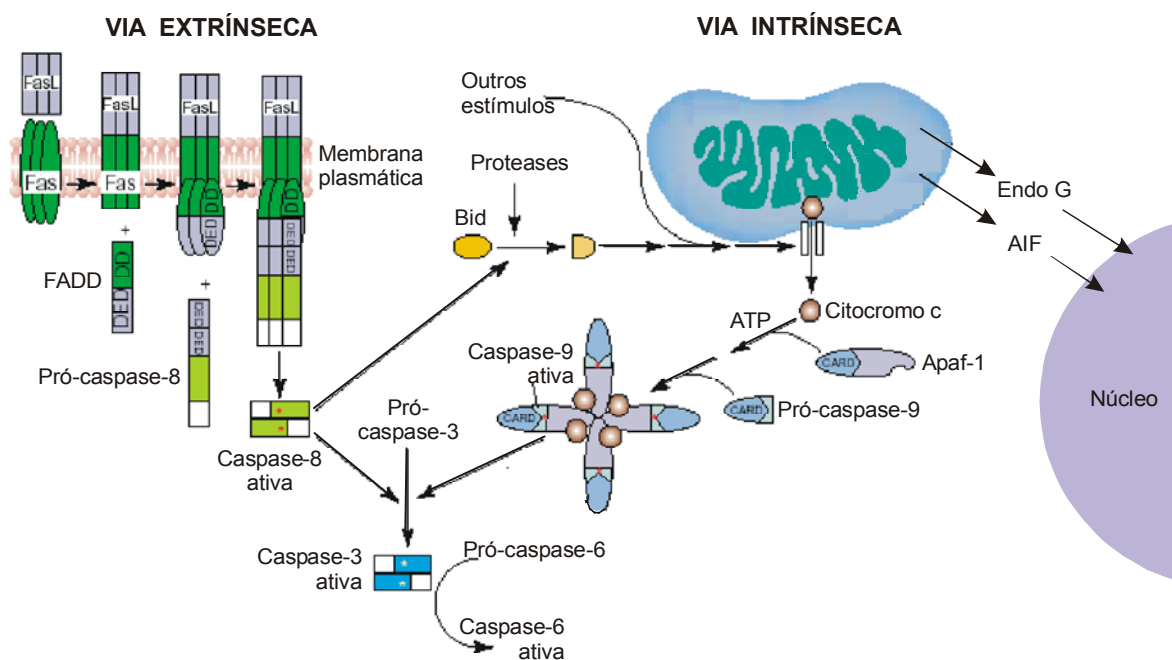


Figura 03. Vias de ativação da apoptose. (Adaptado de Kaufmann & Hengartner, 2001)

Por outro lado, os fatores reguladores mais importantes da via intrínseca são as proteínas da família Bcl-2, como os pró-apoptóticos Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, e

Hrk e os antiapoptóticos Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1, e Mcl-1. Os fatores pró-apoptóticos e antiapoptóticos atuam, respectivamente, ativando ou bloqueando a liberação do citocromo c. Em resposta ao sinal de morte, proteínas pró-apoptóticas sofrem modificações pós-traducionais que incluem defosforilação e clivagem, resultando em sua ativação e translocação para a mitocôndria. Em resposta a esse estímulo apoptótico, a membrana mitocondrial externa torna-se permeável, levando à liberação do citocromo c. Uma vez liberado no citossol, o citocromo c interage com Apaf-1, levando à ativação da pró-caspase 9. A caspase 9 ativa leva à ativação da caspase 3, que conseqüentemente aciona o restante da cascata de caspases que levam à apoptose. As caspases efetoras ativadas induzem a clivagem de proteínas quinases, proteínas do citoesqueleto, proteínas de reparo do DNA, subunidades inibidoras de endonucleases e a destruição dos fatores que regulam a manutenção normal da célula. Outros estímulos, incluindo dano ao DNA, podem induzir a liberação do citocromo c independentemente da clivagem de Bid. Além do citocromo c, outras proteínas mitocondriais, o fator indutor de apoptose (AIF) e a endonuclease G (endo G) são liberados e se dirigem ao núcleo para conduzir os eventos nucleares do processo apoptótico (revisto por Kaufmann & Hengartner, 2001 e Ghobrial *et al.*, 2005).

1.4 – Testes de genotoxicidade e citotoxicidade

Inicialmente a qualquer investigação toxicológica de uma droga, recomenda-se a realização de um teste de citotoxicidade (potencial de induzir morte celular), para determinar a concentração a ser utilizada em ensaios refinados para avaliação da genotoxicidade, indução de mutações e de morte celular programada. A partir do estabelecimento da dose na qual aproximadamente 50% das células são afetadas, é possível comparar quantitativamente as respostas de um composto em diferentes sistemas biológicos ou de vários compostos em um mesmo sistema (revisto por Eisenbrand *et al.*, 2002).

A genotoxicidade de uma substância, definida como o potencial de causar dano ao DNA da célula, pode ser avaliada por meio de diversos ensaios. O ensaio cometa é uma das técnicas que vêm sendo mais amplamente usadas desde que foi desenvolvida, em 1988, por Singh e colaboradores. Essa técnica consiste na lise e eletroforese de células embebidas em agarose, tornando possível a detecção de quebras no DNA de núcleos interfásicos. Dessa forma, o DNA com maior quantidade de danos migra mais rapidamente durante a eletroforese, formando uma imagem semelhante a um cometa. A extensão do dano pode ser avaliado pelo percentual de DNA na cauda do cometa formado (Lee *et al.*, 2003).

A realização dessa técnica em condições alcalinas permite a detecção de quebras em uma única fita do DNA de núcleos interfásicos e apresenta várias vantagens em relação a

outros testes de genotoxicidade, como o requerimento de pequena quantidade de células, que não precisam estar em proliferação, baixo custo, facilidade e rapidez, além de ser bastante sensível na detecção de baixos níveis de danos no DNA (Tice *et al.*, 2000). Tais características validam o ensaio cometa como uma ferramenta eficiente em estudos de toxicologia genética, como o monitoramento de lesões e reparo de DNA de vários tipos celulares.

A fragmentação do DNA, entretanto, pode também ocorrer durante os processos de degeneração celular (revisto por Nagata, 2005). Assim sendo, a interpretação dos resultados obtidos por meio do ensaio cometa pode ser mais precisa quando essa técnica for associada a testes de viabilidade celular (Hartmann & Speit, 1997; Roser *et al.*, 2001). Um desses testes, que permite a distinção entre células viáveis, apoptóticas e necróticas com base na coloração e morfologia nuclear, consiste na coloração das células com alaranjado de acridina e brometo de etídeo. Esses corantes emitem diferentes fluorescências ao intercalarem no DNA, sendo que o brometo só penetra nas células que já perderam a integridade da membrana citoplasmática, ou seja, que estão em necrose ou apoptose tardia (Kosmider *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que, quando se verifica uma provável indução de apoptose, um maior refinamento técnico é exigido para sua comprovação e quantificação. Para tanto, recomenda-se a realização de testes como os ensaios de fragmentação do DNA, de TUNEL e análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão.

O ensaio de fragmentação do DNA, também conhecido como *DNA ladder*, baseia-se na clivagem internucleossomal do DNA característica da apoptose (Wyllie, 1980). Esse teste consiste em observar a formação de discretas bandas de múltiplos de 180 a 200 pares de base em um gel de agarose, sendo uma metodologia de fácil aplicação (Higushi, 2003). Já o ensaio de TUNEL (Marcação de Terminações dUTP pela Deoxinucleotidil Transferase Terminal) é uma técnica imunohistoquímica que detecta terminações 3'-hidroxila características da apoptose. Esse método é considerado mais sensível que o anterior e permite a quantificação do processo. Contudo recomenda-se que seus resultados sejam confirmados por análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão (revisto por Otsuki *et al.* 2003).

1.5 – Linhagens celulares de cabeça e pescoço

No campo da investigação toxicológica, diversos modelos de estudo *in vitro* são amplamente empregados por possibilitarem a utilização de inúmeras técnicas e viabilizarem a investigação mais refinada dos mecanismos de toxicidade. Entre esses modelos, diferentes linhagens celulares podem ser utilizadas, incluindo as linhagens celulares derivadas de cabeça e pescoço HSG (células de glândula submandibular humana) e OSCC-3 (células de epitélio

bucal humano).

Embora haja estudos que relacionem a exposição aos carcinógenos da planta à alta incidência de câncer no trato digestório superior, não se tem relatado a ocorrência de tumores de boca. Considerando que a cavidade bucal é o primeiro local de contato com tais compostos tóxicos e tendo em vista que os tumores malignos de cabeça e pescoço estão entre os mais prevalentes na população brasileira, é importante o estudo em linhagens que possam contribuir para a elucidação dos danos celulares, particularmente os genéticos, possivelmente envolvidos na etiologia de tais neoplasias. A utilização de uma linhagem de epitélio de revestimento bucal (OSCC-3) e outra glandular (HSG) justifica-se por representarem tecidos que sofrem exposição aos carcinógenos da planta de maneira direta e indireta (sistêmica), respectivamente.

1.5.1 - HSG

A linhagem de células ductais tumorais de glândula submandibular humana (HSG) foi estabelecida em 1981 a partir de uma glândula salivar humana irradiada (Shirasuna *et al.*, 1981). Desde então, as células HSG têm sido utilizadas em diversos estudos. Aframian *et al.* (2000) realizaram testes preliminares no campo da engenharia de tecidos visando observar as melhores condições de cultivo para a obtenção futura de uma glândula salivar artificial para pacientes que sofrem de hipofunção. Outros trabalhos estudaram a diferenciação celular cultivando-se essas células sobre um extrato de lâmina basal, resultando na formação de uma organização semelhante à de ácinos glandulares (Wang *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2000). Atsumi *et al.* (2001a e b) e Hashitani *et al.* (2003) trataram essas células com substâncias terapêuticas em estudos de citotoxicidade. Essa linhagem celular também foi empregada em testes da terapia fotodinâmica (Kaneko *et al.*, 2004) e para compreensão do mecanismo da Síndrome de Sjögren (Ohlsson *et al.*, 2002). A indução de apoptose nessas células bem como os mecanismos desse processo também têm sido muito estudados (Kawase *et al.*, 1999; Kamachi *et al.*, 2002; Aiko *et al.*, 2002).

1.5.2 – OSCC-3

A linhagem celular OSCC-3 (*oral squamous cells carcinoma* – carcinoma de células escamosas orais) é derivada de carcinoma epidermóide bucal, tipo mais freqüente de câncer de boca, abrangendo mais de 90% dos casos (Lee *et al.* 2002). Essas células têm sido empregadas principalmente em estudos que visam compreender os mecanismos da carcinogênese (Sartor *et al.*, 1999) bem como os fatores que induzem a progressão tumoral (Hasina *et al.*, 2003). Outros trabalhos têm utilizado essas células em modelos de estudo de

crescimento tumoral e angiogênese em camundongos imunodeficientes, visando desenvolver tratamentos antitumorais mais eficazes (Nor *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005). Além de trabalhos direcionados ao estudo do câncer, as células OSCC-3 também têm sido empregadas em ensaios de citotoxicidade, como os realizados por González *et al.* (2005), que observaram os efeitos do tratamento com extratos de erva mate sobre a proliferação dessas células.

1.6 – Objeto de estudo

Considerando os importantes impactos da samambaia *P. aquilinum* na saúde humana e na pecuária e visando contribuir para o entendimento dos mecanismos por meio dos quais essa planta causa efeitos tóxicos, o presente trabalho visa investigá-los, estudando os efeitos de diferentes concentrações do extrato da planta sobre as linhagens celulares derivadas de cabeça e pescoço HSG e OSCC-3 por meio de testes de citotoxicidade e genotoxicidade.

2. Objetivos

2.1 - Objetivo geral:

Considerando os relatos da literatura a respeito do impacto da exposição à planta *P. aquilinum* e seus compostos tóxicos, este trabalho tem como objetivo estudar a citotoxicidade e genotoxicidade do extrato aquoso não fracionado dessa samambaia sobre linhagens celulares de cabeça e pescoço.

2.2 - Objetivos específicos:

Avaliar os mecanismos de toxicidade induzida pelo extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum* em três diferentes concentrações sobre as células HSG e OSCC-3 por meio de ensaio de genotoxicidade, análise morfológica e ensaios de citotoxicidade e de detecção de apoptose.

3. Material e Métodos

3.1 - Preparo do extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum*

A planta *P. aquilinum* utilizada neste estudo foi coletada na Fazenda Água Limpa – Universidade de Brasília, região do Distrito Federal. Depois de lavados e secos, os brotos (Figura 04A) foram desidratados e triturados (Figura 04B) para obtenção do extrato aquoso não fracionado, colocando-se 3,084g de pó de samambaia em 50 mL de água destilada, à temperatura ambiente e protegida da luz, por duas horas, obtendo-se uma solução cuja concentração era, em média, 14,8 mg/mL. Essa solução foi filtrada duas vezes em papel de filtro e esterilizada com filtro de acetato de celulose com poros de 0,22 μm (*Millipore*). O extrato foi mantido congelado em alíquotas de 1mL à temperatura de -20°C . Tal preparação foi feita conforme descrito por Almeida Santos (1999).



Figura 04. Brotos de *P. aquilinum* utilizados neste estudo. (A) broto; (B) broto triturado.

3.2 - Manutenção da cultura de células HSG e OSCC-3

As células HSG e OSCC-3, generosamente cedidas pelo Professor Doutor B. J. Baum (National Institute of Health, Bethesda, USA) foram mantidas em meio de cultura *DMEM* (*GIBCO-BRL*), em pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (*GIBCO-BRL*) e acrescido de 1% de antibiótico e antimicótico (*GIBCO-BRL* - 10000 unidades de penicilina G sódica, 10 mg de sulfato de estreptomicina, 25 μg de anfotericina B dissolvidos em 1mL de solução salina a 0,85%).

As culturas foram estabelecidas a partir de uma passagem inicial de 10^5 células em frascos de cultura de poliestireno de 25 cm^2 ou 2×10^5 células em frascos de 75 cm^2 e mantidas à 37°C , em atmosfera de 5% de CO_2 e 70% de umidade. Para estabelecimento de subculturas, as células eram soltas do fundo do frasco por tratamento com solução de tripsina-EDTA contendo 2,5 g/L de tripsina (1:250) e 0,38 g/L de EDTA em *Hank's Balanced Salt Solution* sem cloreto de cálcio, cloreto de magnésio ou sulfato de magnésio (*GIBCO-BRL*) por três minutos a 37°C . A suspensão de células era transferida para um tubo de centrífuga

contendo meio de cultura com soro fetal bovino para inativação da tripsina e, em seguida, centrifugada a 750 x g por 5 minutos. As células eram contadas em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) e passadas para novo frasco de cultura.

3.3 – Determinação do tempo de tratamento e das concentrações de extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum* a ser administrado às células HSG e OSCC-3

De modo a determinar o tempo de tratamento e a concentração do extrato de *P. aquilinum* utilizados neste estudo, foram realizados, em triplicata, experimentos de viabilidade celular. Para isso, as culturas foram mantidas em placas de poliestireno de 6 poços contendo, cada um deles, inicialmente 10^5 células. Após a adesão das células à placa, o meio de cultura foi trocado por novo meio contendo ou não o extrato de *P. aquilinum*.

As concentrações do extrato de *P. aquilinum* foram definidas diluindo-o em meio de cultura, a partir da concentração correspondente (0,67 mg/mL) à administrada por Almeida-Santos (1999) à cultura de linfócitos humanos, de forma que se obtiveram as três concentrações testadas, como mostra a Tabela 01. Os tempos de tratamento testados foram 4, 8, 12, 24 e 48 horas.

Tabela 01. Tratamentos administrados às células HSG e OSCC-3 para o teste de viabilidade celular na presença do extrato de *P. aquilinum*

Tratamento	Concentração do extrato (mg/mL)
Controle negativo	-
Extrato de <i>P. aquilinum</i>	0,34
Extrato de <i>P. aquilinum</i>	0,67
Extrato de <i>P. aquilinum</i>	1,34

Após cada intervalo de tempo de tratamento, os sobrenadantes de cada cultura foram descartados, as células foram soltas do fundo do frasco utilizando-se solução de tripsina-EDTA, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura. Dessa amostra, foram retirados 10 μ L que foram subsequenteiramente adicionados a 190 μ L de solução salina contendo 0,4% do corante vital azul de tripano de modo a efetuar-se, em câmara de Neubauer, a contagem de células viáveis. O corante vital azul de tripano penetra apenas nas células que perderam a integridade da membrana citoplasmática. Assim, enquanto as células não viáveis se coram, as células viáveis permanecem transparentes.

3.3.1 – Análise estatística

De modo a definir o par “concentração do extrato de *P. aquilinum* / tempo de tratamento” foi utilizado o teste *t-student* pareado e o nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

3.4 - Tratamento experimental das células HSG e OSCC-3

A análise estatística dos dados obtidos no teste de viabilidade celular mostrou que, diferentemente do observado nos demais pontos experimentais (concentração/tempo de exposição), tanto nas células HSG quanto nas OSCC-3, o tratamento por 48 horas com extrato de *P. aquilinum* na concentração de 0,67 mg/mL permitiu uma taxa de viabilidade próxima a 50% da observada no controle negativo correspondente, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Nesse contexto, decidiu-se que seria feito o tratamento experimental das células HSG e OSCC-3 por 48 horas, utilizando-se a concentração de 0,67 mg/mL de extrato de *P. aquilinum*. Adicionalmente, duas frações dessa concentração - 0,20 mg/mL e 0,40 mg/mL, correspondentes a 30% e 60% de 0,67 mg/mL, respectivamente - foram utilizadas. De modo a seguir os padrões estabelecidos nos estudos de genotoxicidade e citotoxicidade de uma substância, foi incluído no experimento um grupo de células tratado com peróxido de hidrogênio na concentração final de 1mM (0,034 mg/mL), de acordo com Ceschini (2003). Esse grupo constituiu o controle positivo. Os grupos experimentais utilizados neste estudo encontram-se descritos na Tabela 02.

Tabela 02. Grupos experimentais utilizados para avaliação dos efeitos do extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum* sobre as células HSG e OSCC-3

Grupo experimental		Tratamento (mg/mL)	
HSG	OSCC-3	Extrato de <i>P. aquilinum</i>	H ₂ O ₂
T1	T6	-	-
T2	T7	0,20	-
T3	T8	0,40	-
T4	T9	0,67	-
T5	T10	-	0,034

3.5 - Avaliação dos danos no DNA por meio de eletroforese de células isoladas em microgel – “Ensaio Cometa”

O ensaio cometa foi realizado, em duplicata, segundo o protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) e modificado por Olive *et al.* (1990). Para esse ensaio, as culturas de células HSG e OSCC-3 foram cultivadas e mantidas segundo os procedimentos descritos no item 3.2. Após a adesão das células ao fundo do frasco, foi adicionado ao meio de cultura o respectivo tratamento, conforme descrito na Tabela 02.

Após 48 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado e colocado em frascos de centrífuga aos quais foram adicionadas as células depois de soltas do fundo da placa. As amostras foram, então, centrifugadas a 750 x g e as células ressuspensas em 1mL de PBS. Esse procedimento foi repetido por duas vezes. As amostras foram ressuspensas em 20µL de PBS. Cada amostra foi misturada a 240 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point agarose* – LMP - *Sigma*) a 0,5 % em PBS e aquecida a 37° C em banho-maria. Imediatamente após esse procedimento, 130 µL dessa mistura foram gotejados em uma lâmina de microscopia de vidro de 26 x 76 mm previamente preparada. A preparação das lâminas foi feita imergindo-as em agarose tipo II diluída em PBS a 1,5% e depois mantendo-as à temperatura ambiente, por período mínimo de 12 horas. Após o gotejamento das células em agarose LMP sobre as lâminas, uma lamínula foi acoplada a cada lâmina e o conjunto foi levado à geladeira. A partir dessa etapa, as lâminas estiveram sempre protegidas da luz, a fim de prevenir novas quebras no DNA.

Após 5 minutos na geladeira, as lamínulas foram removidas e as lâminas mergulhadas em solução de lise gelada (2,2 M de NaCl, 89,0 mM de EDTA, 8,9 mM de Tris, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO).

Depois de pelo menos uma hora no tampão de lise a 4° C, as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão de eletroforese fresco (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13,4). Após 25 minutos em repouso, procedeu-se à eletroforese a 25 V (0,86 V / cm) e 300 mA por um período de 20 minutos a 4° C. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5). Esse procedimento foi realizado por três vezes em intervalos de 5 minutos.

As lâminas foram guardadas a 4° C e os núcleos foram corados no momento da análise. A coloração foi feita gotejando-se sobre as lâminas 50 µL de solução aquosa de brometo de etídeo (20 µg/mL).

3.5.1 - Análise visual dos danos no DNA

Após serem corados, os nucleóides das células HSG e OSCC-3 foram analisados em teste cego, utilizando-se um microscópio de fluorescência Zeiss-Axiophot filtro de 510-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400x.

De cada grupo experimental, aproximadamente 200 nucleóides (100 de cada amostra, no mínimo) foram analisados e classificados de acordo com a integridade do núcleo e o comprimento da cauda formada, conforme descrito por Jalonszynski *et al.* (1997). Desse modo, os nucleóides analisados foram classificados de 0 a 4, segundo seu grau de lesão, conforme ilustra a Figura 05.

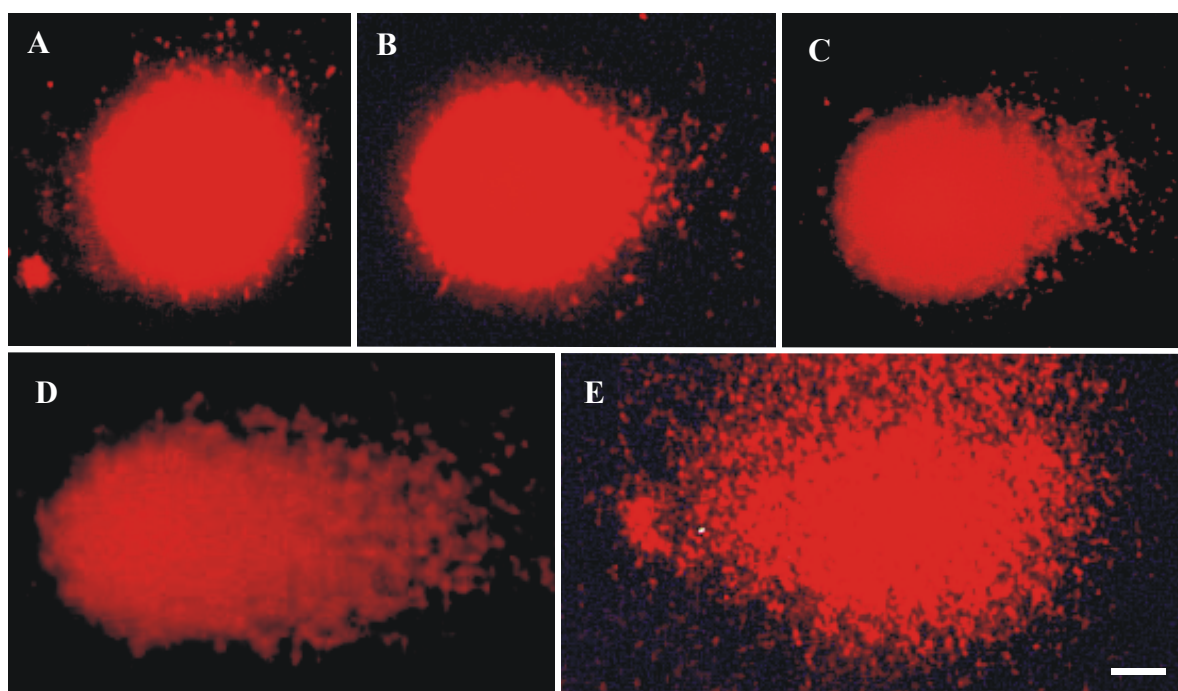


Figura 05. Fotomicrografia de fluorescência de nucleóides de células HSG classificados em padrões preestabelecidos (A) Classe 0; (B) Classe 1; (C) Classe 2; (D) Classe 3; (E) Classe 4. Barra de tamanho = 10 μ m.

Para a quantificação do dano no DNA, o escore total para os 100 nucleóides analisados variou de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 400 (dano máximo = todas as células com dano de classe 4), sendo estimada a partir da fórmula:

$$ID \text{ (ua)} = \frac{N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4}{S/100}$$

onde,

ID = índice de dano no DNA;

ua= unidade arbitrária

N1, N2, N3 e N4 = cometas nas classes 1, 2, 3 e 4, respectivamente;

S = número de cometas analisados, incluindo os da classe 0.

Essa análise possibilitou, ainda, a quantificação da frequência de células com danos no DNA.

3.5.1.1 – Análise estatística

Para a análise estatística do índice de dano no DNA, foi utilizada a transformação “log x”, adequada para números absolutos, onde x é o escore de dano no DNA (ID); em seguida, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa *StatView*. Nos casos em que foram detectadas diferenças entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Fisher em nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

O mesmo procedimento foi realizado para a análise estatística da frequência de células com dano no DNA, porém a transformação dos dados foi feita utilizando-se a função “arcsen \sqrt{x} ”, adequada para números relativos, onde, dentre as células examinadas, x é a proporção de células com danos no DNA.

3.5.2 – Análise dos danos no DNA por meio do programa CASP

Dos mesmos 100 nucleóides de cada amostra analisados visualmente, 50 foram também analisados por meio do programa *CASP* (Konca *et al.*, 2003). Para isso, as lâminas foram analisadas ao microscópio de fluorescência Zeiss-Axiophot equipado com uma câmera CCD (*Digital Eyepiece Camera DEC-18 - WPI*) acoplada à sua ocular. As imagens foram digitalizadas utilizando-se o programa *ScopePhoto*.

O programa *CASP* (Figura 06) possibilita quantificar a extensão do dano ao DNA. Seu algoritmo assume que os pontos mais intensos estão localizados na cabeça e que os cometas estão orientados no sentido da esquerda para a direita da imagem. A partir da delimitação de cabeça e cauda, podem-se encontrar valores para o raio e a área da cabeça, para o comprimento e a área da cauda, possibilitando estabelecer-se uma relação entre eles.

Os resultados dessa análise foram expressos em termos de percentual médio de DNA fragmentado na cauda dos cometas formados.

3.5.2.1 – Análise estatística

Para a análise estatística do percentual médio de DNA fragmentado na cauda dos cometas analisados, foi utilizada a transformação “arcsen \sqrt{x} ”, adequada para números relativos, onde x é o percentual médio de DNA fragmentado encontrado na cauda dos 50

cometas analisados em duplicata de cada um dos grupos experimentais. Em seguida, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa *StatView*. Nos casos em que forem detectadas diferenças entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Fisher em nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

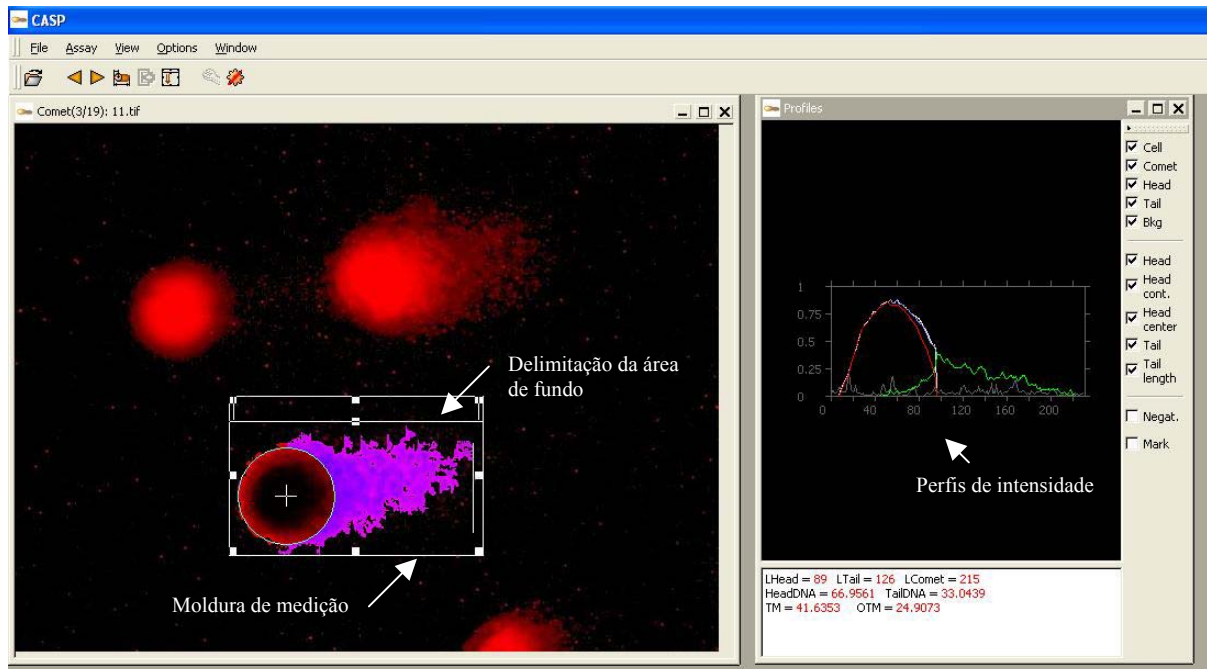


Figura 06. Representação das janelas do programa *CASP*. Na janela da esquerda, uma imagem de cometa é visível dentro da moldura para medição, com cabeça e cauda marcados. Essa moldura apresenta uma subdivisão superior, que delimita parte área de fundo. Na janela da direita, estão expressos os perfis de intensidade e, abaixo, os resultados das medições gravados.

3.6 – Análise de danos ao DNA de células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato de *P. aquilinum* por meio do ensaio de fragmentação do DNA - “DNA ladder”

Para o ensaio de *DNA ladder*, realizado em triplicata, células HSG e OSCC-3 foram cultivadas e mantidas segundo os procedimentos descritos no item 3.2. Desse modo, após a adesão das células, foi adicionado aos meios de culturas o respectivo tratamento, conforme representado na Tabela 02.

Após 48 horas de tratamento, tanto as células em suspensão quanto as aderidas foram coletadas, centrifugadas, em conjunto, a 750 x g por 5 minutos e ressuspensas em 1mL de PBS. Esse procedimento foi repetido por duas vezes e as células foram ressuspensas em 200µL de PBS.

A extração do DNA das células HSG e OSCC-3 para esse ensaio foi feita utilizando-se o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)*, segundo as orientações do fabricante. O

DNA extraído teve sua concentração determinada em espectrofotômetro (*GeneQuant Pharmacia Biotech*) e foi mantido a 4° C até o momento da aplicação no gel. De cada amostra, 2µg foram dissolvidos em tampão de amostra 10X (0,42% de azul de bromofenol, 50% de glicerol) e aplicados em gel de agarose a 1% contendo 5 µg/mL de brometo de etídeo, de modo a se efetuar a eletroforese. Esta foi realizada a 40V por um período de aproximadamente 3 horas. Para caracterizar a massa aproximada de possíveis fragmentos de DNA gerados, foi utilizado um marcador de massa molecular de 100 pares de base (*Invitrogen*). Posteriormente, o gel foi posicionado em um transiluminador UV para a visualização do DNA e obtenção da imagem.

3.7 - Análise da morfologia das células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum*

3.7.1 - Processamento das células HSG e OSCC-3 para análise da morfologia celular em microscopia de luz

Para a análise morfológica em microscopia de luz, as células foram preparadas conforme realizado por Oliveira-Pereira (2002), com pequenas alterações. Desse modo, primeiramente uma lamínula de microscopia de vidro (18 x 18 mm) foi posicionada em cada um dos seis poços de uma placa de cultura e tratada por 30 minutos com poli-L-lisina (0,1 mg/mL). Cada um dos seis poços recebeu 2 mL de meio de cultura e 10⁵ células. Uma vez aderidas às lamínulas, as células receberam o tratamento, conforme a Tabela 02. Os testes foram feitos em duplicata.

Após as 48 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS (NaCl 0,154 M; Na₂HPO₄ 0,1 M; pH 7,4). Esse procedimento foi repetido por três vezes. De cada grupo experimental, as células aderidas a uma das lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 2% em tampão fosfato por 10 minutos. Depois de serem lavadas com PBS, as células foram coradas com solução de violeta de cresil 0,2% em etanol 20%, por cinco minutos.

As células aderidas à outra lamínula, em cada um dos grupos experimentais, foram coradas com solução de Giemsa 4% em metanol, por 5 minutos, sem que passassem por processo de fixação.

Após serem lavadas com PBS, as lamínulas foram retiradas dos poços e montadas sobre lâminas de vidro para microscopia (26 x 76 mm), com a face contendo as células coradas em contato com a lâmina. As células foram imediatamente analisadas e fotografadas em microscópio Zeiss Axiophot, com ocular de 10X e objetiva de 100X.

3.7.2 - Processamento das células HSG e OSCC-3 para análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise morfológica em microscopia eletrônica de transmissão, as culturas de células foram mantidas segundo os procedimentos descritos no item 3.2. Após a adesão das células ao fundo do frasco, foi adicionado o tratamento ao meio de cultura, conforme descrito na Tabela 02. Após 48 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado e colocado em frascos de centrifuga aos quais foram adicionadas as células depois de soltas do fundo do frasco. As amostras foram, então, centrifugadas a 750 x g e as células ressuspensas em 1mL de PBS. Esse procedimento foi repetido por duas vezes.

Em seguida, as células foram processadas de acordo com o protocolo utilizado por Silveira *et al.* (2003), com algumas modificações. Assim, as células foram ressuspensas em 1 mL de fixador constituído de 2% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, e 3% de sacarose. Após uma hora, as amostras foram centrifugadas a 750 x g e lavadas, por 10 minutos, com tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,4) acrescido de 3% de sacarose. Esse procedimento foi repetido por duas vezes. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas por uma hora, protegidas da luz, na mistura composta por tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM diluído em tampão de sódio (0,1 M, pH 7,4). Após serem lavadas duas vezes com tampão cacodilato de sódio por 10 minutos, as células foram contrastadas *in bloc* com acetato de uranila aquoso 0,5% por uma hora, protegidas da luz. Em seguida, foram lavadas com tampão cacodilato de sódio, por dez minutos e, posteriormente, com água destilada. As células foram então desidratadas em concentrações crescentes de acetona: 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (esta última repetida três vezes). O tempo de desidratação foi de dez minutos para cada uma das concentrações de acetona.

Após a desidratação, as amostras foram infiltradas na mistura resina : acetona em concentrações crescentes de resina Spurr e decrescentes de acetona, em movimento giratório. Cada infiltração teve duração de, aproximadamente, 12 horas. Uma última infiltração foi feita somente com resina Spurr, por 7 a 8 horas, com o tubo aberto de modo a facilitar a evaporação da acetona remanescente. Em seguida, as amostras foram incluídas em formas de emblocamento contendo nova resina. O material foi mantido em estufa a 57 °C, por, aproximadamente, 72 horas.

Os blocos contendo as células foram levados ao ultramicrotomo *Reichert Supernova* com navalha de diamante para obtenção de cortes ultrafinos, que foram colhidos em telas de cobre de 400 *Mesh*. A contrastação das amostras foi feita protegida da luz, colocando-se

primeiramente as telinhas em contato com solução de acetato de uranila 3% durante 25 minutos. Depois de lavadas em água destilada, as mesmas foram colocadas em contato com citrato de chumbo por 5 minutos. Após as telinhas serem lavadas em água destilada e deixadas secar por pelo menos 12 horas, as células foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão *JEOL 100C*.

3.8 – Distinção entre as vias de degeneração apoptose e necrose das células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum* por meio do ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo

Para o ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo, realizado em duplicata, células HSG e OSCC-3 foram cultivadas e mantidas segundo os procedimentos descritos no item 3.2. Deste modo, quando as células estavam aderidas ao fundo da placa, foi adicionado aos meios de culturas o respectivo tratamento, conforme representado na Tabela 02. Após as 48 horas de tratamento, as células em suspensão e as aderidas ao frasco (depois de descoladas com solução de tripsina-EDTA) foram coletadas, centrifugadas, em conjunto, a 750 x g por 5 minutos e ressuspensas em 100 µL de meio de cultura. De cada amostra, foram retirados 20 µL, aos quais foram subsequentemente adicionados 2 µL de uma mistura recém-preparada dos corantes alaranjado de acridina (100 µg/mL) e brometo de etídeo (100 µg/mL), na proporção de 1:1.

As células coradas foram então colocadas sobre lâminas de microscopia de vidro de 26 x 76 mm e, após montagem com lamínulas de vidro de 24 x 50 mm, foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss-Axiophot com barreira de filtro de 530 nm. De cada grupo experimental, foram analisadas cerca de 400 células, 200 em cada uma das duplicatas, no mínimo.

3.8.1 - Critérios para classificação das células em apoptóticas, necróticas ou viáveis

O corante alaranjado de acridina penetra nas células vivas e mortas, emitindo fluorescência verde ao intercalar com o DNA e laranja, com o RNA. O brometo de etídeo, no entanto, só penetra nas células que já possuem alterações na membrana citoplasmática (apoptose tardia ou necrose), emitindo, assim, fluorescência laranja ao intercalar com o DNA. A detecção e a quantificação de células em apoptose e necrose foi realizada, portanto, por meio da análise de dois parâmetros – a cor e o aspecto morfológico da célula.

Dessa forma, segundo Takahashi *et al.* (2004) e Kosmider *et al.* (2004) diferentes padrões celulares podem ser observados e classificados:

- a) células vivas possuem núcleo verde uniforme, citoplasma de tamanho normal levemente alaranjado;
- b) células em apoptose podem apresentar as seguintes características:
 - apoptose inicial - como as células ainda possuem membrana celular contínua, o núcleo é verde, porém irregular. A cromatina apresenta-se condensada e/ou fragmentada;
 - apoptose tardia - como nessa etapa as células já perderam a integridade da membrana plasmática, o brometo de etídeo predomina sobre o alaranjado de acridina, corando o núcleo de laranja. A cromatina apresenta-se condensada e/ou fragmentada. Além disso, segundo Liu *et al.* (2004), as células podem apresentar corpos apoptóticos;
- c) células necróticas apresentam-se intumescidas e com núcleo laranja uniforme por terem perdido a integridade da membrana plasmática. Algumas vezes pode-se observar a liberação do conteúdo celular.

3.8.2 – Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizada a transformação “ $\arcsen \sqrt{x}$ ”, onde, dentre as células examinadas, x é a proporção de células com a característica em estudo; em seguida, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa *StatView*. Nos casos em que foram detectadas diferenças entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Fisher com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.9 – Detecção de apoptose nas células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato de *P. aquilinum* por meio do ensaio de TUNEL

Uma característica típica da destruição celular por apoptose é a ativação de nucleases que eventualmente degradam o DNA nuclear em fragmentos de aproximadamente 200 pares de base. A detecção desses fragmentos é relativamente simples por meio do ensaio de TUNEL (*Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling* – Marcação de Terminações dUTP pela Deoxinucleotidil Transferase Terminal).

Esse teste baseia-se no fato de que a fragmentação do DNA em células apoptóticas expõe um grande número de terminações 3'-hidroxila. Esses grupos hidroxila podem servir de pontos de iniciação para a deoxinucleotidil transferase terminal (TdT), que adiciona deoxirribonucleotídeos de uma maneira dependente de molde. A adição de um análogo da deoxitimidina, a 5-bromo-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (BrdUTP) à reação com a TdT serve como uma marca identificadora dos locais de quebra. Uma vez incorporado ao DNA, o BrdU

pode ser detectado por um anticorpo anti-BrdU conjugado a um fluorocromo, empregando-se técnicas de imunohistoquímica.

Para esse experimento, realizado em duplicata, as células HSG e OSCC-3 foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² a partir de uma passagem inicial de 5 x 10⁵ células. Quando aderidas ao fundo do frasco, as células receberam os tratamentos conforme os grupos experimentais descritos na Tabela 02. Após 48 horas de tratamento, tanto as células em suspensão quanto as aderidas foram coletadas, centrifugadas em conjunto a 750 x g por 5 minutos e ressuspensas em 1mL de PBS. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, o sedimento foi ressuspensão em 500 µL de PBS e o ensaio de TUNEL foi realizado utilizando-se o kit APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit *with Alexa Fluor® 488 anti-BrdU (Invitrogen), segundo as orientações do fabricante.

3.9.1 - Análise visual do ensaio de TUNEL

De modo a realizar a análise visual desse ensaio, após o processamento mencionado acima, a suspensão de células foi depositada em lâminas de vidro para microscopia (26 x 76 mm) e coberta por uma lamínula. As células HSG e OSCC-3 foram analisados em teste cego, utilizando-se um microscópio de fluorescência Zeiss-Axiophot filtro de 510-560 nm, barreira de filtro de 530 nm e aumento total de 400x.

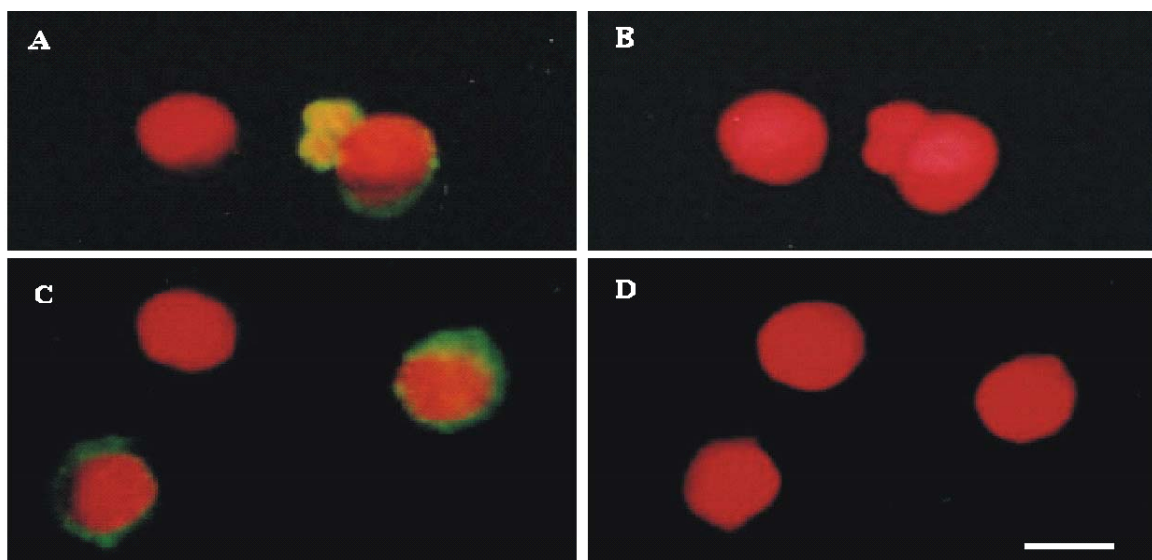


Figura 07. Células HSG (A e B) e OSCC-3 (C e D), após o ensaio de TUNEL, observadas ao microscópio de fluorescência. (A e C – barreira de filtro de 530 nm), (B e D – barreira de filtro de 590 nm). Células em apoptose marcadas com fluorescência verde. Barra de tamanho = 10 µm

De cada grupo experimental, aproximadamente de 200 células (100 de cada amostra, no mínimo) foram analisados e classificados em apoptóticas e não apoptóticas, conforme ilustrado na Figura 07. As células classificadas como não apoptóticas emitiam fluorescência vermelha, devido à contracoloração com iodeto de propídeo, que se intercala ao DNA indistintamente; e as apoptóticas emitiam também a fluorescência verde, devido à marcação com o anticorpo anti-BrdU conjugado à fluoresceína.

3.9.1.1 – Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizada a transformação “arcsen \sqrt{x} ”, onde, dentre as células examinadas, x é a proporção de células com a característica em estudo; em seguida, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa *StatView*. Nos casos em que foram detectadas diferenças entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Fisher com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.9.2 – Análise do ensaio de TUNEL por citometria de fluxo

De modo a realizar a análise desse ensaio por citometria de fluxo, as amostras de células processadas conforme mencionado anteriormente foram transferidas para tubos para citometria de 12 x 75 mm e levadas ao citômetro *FACSCalibur Cell Analyzer (Becton Dickinson)*. Para cada um dos tubos contendo células marcadas, foram adquiridos 2×10^4 eventos e foram registradas em um total de células analisadas de cada amostras, a frequência de células marcadas com o anticorpo anti-BrdU conjugado à fluoresceína. A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa *Cell Quest (Becton Dickinson, EUA)*.

3.9.2.1 – Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizada a transformação “arcsen \sqrt{x} ”, onde, dentre as células examinadas, x é a proporção de células com a característica em estudo; em seguida, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa *StatView*. Nos casos em que foram detectadas diferenças entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Fisher com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. *Resultados*

4.1 – Determinação do tempo de tratamento e das concentrações de extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum* a serem empregados nos testes com as células HSG e OSCC-3

Para a determinação do tempo de tratamento e da concentração-base de extrato de samambaia a serem utilizados neste estudo, foram realizados, em triplicata, testes de viabilidade celular das linhagens HSG e OSCC-3.

As médias dos valores obtidos nas contagens estão expressas nas Tabelas 03 e 04 e nas Figuras 08 e 09.

Tabela 03: Número médio de células HSG viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato de *P. aquilinum*, em diferentes intervalos de tempo

Concentrações de extrato de <i>P. aquilinum</i>	Tempo de tratamento (horas)				
	4	8	12	24	48
Controle negativo	$1,29 \times 10^5$	$0,62 \times 10^5$	$0,86 \times 10^5$	$1,16 \times 10^5$	$12,00 \times 10^5$
0,34 mg/mL	$1,08 \times 10^5$	$0,68 \times 10^5$	$0,98 \times 10^5$	$0,95 \times 10^5$	$10,20 \times 10^5$
0,67 mg/mL	$1,44 \times 10^5$	* $0,90 \times 10^5$	$1,06 \times 10^5$	* $0,85 \times 10^5$	* $7,54 \times 10^5$
1,34 mg/mL	$1,06 \times 10^5$	$0,77 \times 10^5$	$0,95 \times 10^5$	* $0,62 \times 10^5$	* $1,58 \times 10^5$

* médias significativamente diferentes da média do controle negativo correspondente ($p < 0,05$)

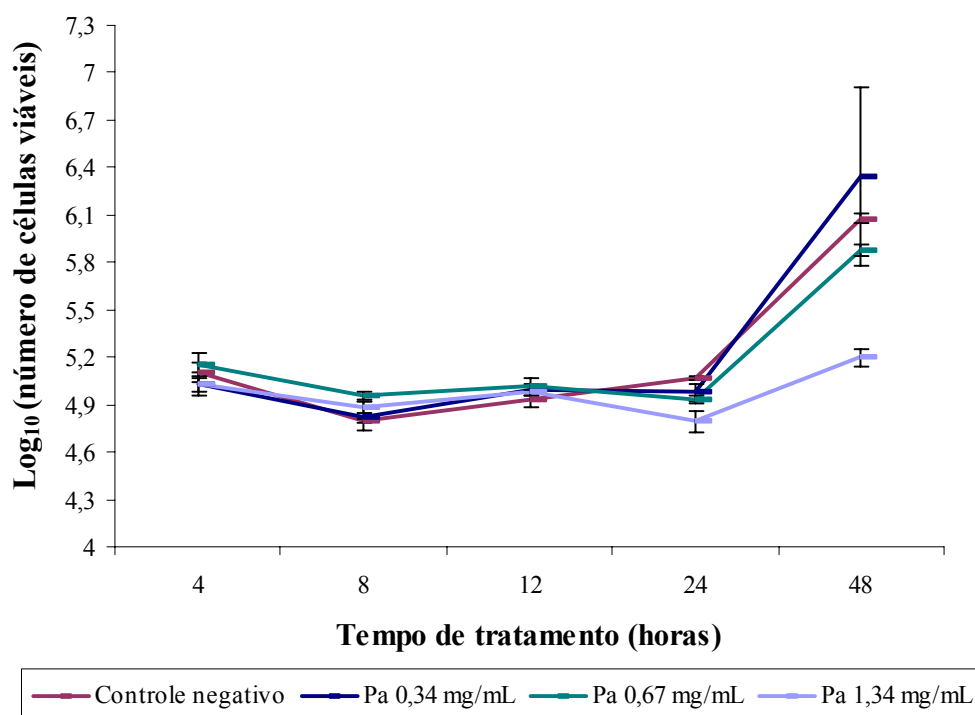
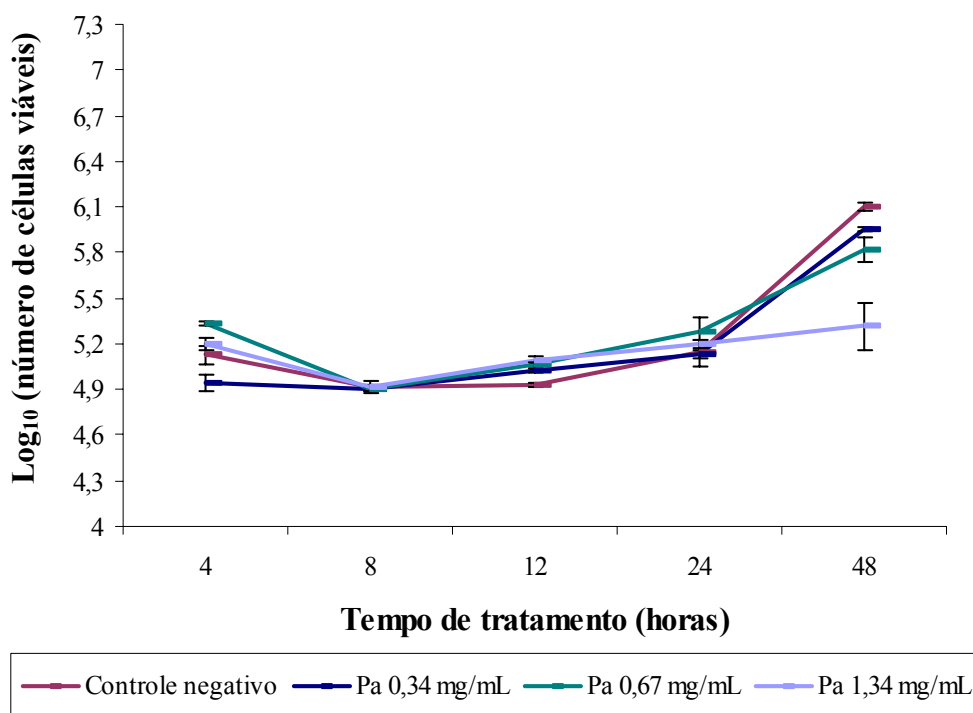


Figura 08. Número médio de células HSG viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes intervalos de tempo.

Tabela 04: Número médio de células OSCC-3 viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato de *P. aquilinum* em diferentes intervalos de tempo

Concentrações de extrato de <i>P. aquilinum</i>	Tempo de tratamento (horas)				
	4	8	12	24	48
Controle negativo	$1,34 \times 10^5$	$0,83 \times 10^5$	$0,85 \times 10^5$	$1,40 \times 10^5$	$12,7 \times 10^5$
0,34 mg/mL	$0,89 \times 10^5$	$0,81 \times 10^5$	* $1,07 \times 10^5$	$1,35 \times 10^5$	$9,00 \times 10^5$
0,67 mg/mL	* $2,15 \times 10^5$	$0,80 \times 10^5$	* $1,15 \times 10^5$	* $1,96 \times 10^5$	* $6,56 \times 10^5$
1,34 mg/mL	$1,59 \times 10^5$	$0,82 \times 10^5$	* $1,25 \times 10^5$	$1,59 \times 10^5$	* $2,56 \times 10^5$

* médias significativamente diferentes da média do controle negativo correspondente ($p < 0,05$)

**Figura 09.** Número médio de células OSCC-3 viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes intervalos de tempo.

Aos valores obtidos nas contagens, foi aplicado o teste *t-student* pareado, com significância de 5% ($p < 0,05$). Assim, observou-se que o tratamento com 0,67 mg/mL por 48 horas foi o que levou a uma redução de aproximadamente 50% no número de células viáveis, em relação ao controle negativo.

Além da concentração de 0,67 mg/mL de extrato de *P. aquilinum*, duas frações dessa concentração, 0,20 mg/mL e 0,40 mg/mL (30% e 60%, respectivamente) também foram empregadas, visando verificar a partir de qual delas já se observavam alterações e se essas ocorriam de forma dependente da dose.

4.2 – Avaliação dos danos no DNA em células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato de *P. aquilinum* por meio do ensaio de eletroforese de células isoladas em microgel – “Ensaio Cometa”

Os resultados obtidos com esse ensaio estão apresentados de três formas: a) frequência de células com dano no DNA (FD), que indica o percentual de células que, em cada grupo experimental, foi classificado como cometa de classe 1, 2, 3 ou 4; b) índice de dano no DNA (ID), que reflete a intensidade do dano no DNA dessas células, sendo calculado como descrito no item 3.6.1 de Material e Métodos; c) percentual médio de DNA na cauda do cometa, ou seja, percentual de DNA fragmentado, calculado pelo programa *CASP*.

4.2.1- Células HSG

A frequência de células com dano no DNA, em cada grupo experimental, está representada na Figura 10.

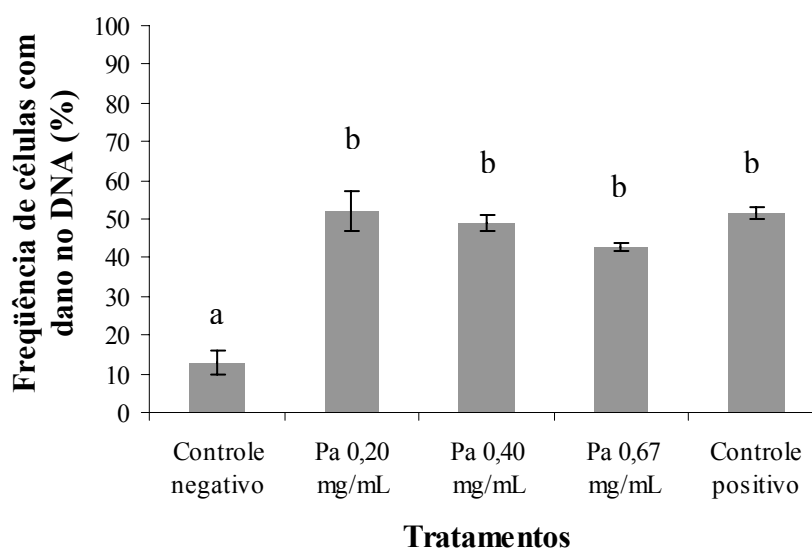


Figura 10. Frequência de células HSG com dano no DNA após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas.

Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

Como se pode observar, a frequência de células com dano no DNA nos grupos tratados com extrato de *P. aquilinum* nas concentrações de 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67 mg/mL (51,89%; 49,05% e 42,57%, respectivamente) e no grupo controle positivo, tratado com peróxido de hidrogênio (51,50%), foi significativamente superior à do grupo controle negativo (12,84%). Vale ressaltar, porém, que os grupos tratados, qualquer que fosse a

concentração do extrato, não apresentam diferença significativa entre si nem mesmo quando comparados ao controle positivo.

As Figuras 11 e 12 ilustram a quantificação do dano no DNA por meio do índice de dano e do percentual médio de DNA na cauda, respectivamente.

Os índices de dano no DNA verificados nas células HSG corroboram os resultados observados quanto à frequência células com dano no DNA, uma vez que os valores observados nos grupos tratados com extrato de *P. aquilinum* nas concentrações de 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67 mg/mL (86,95 ua; 105,71 ua e 101,98 ua; respectivamente) e no grupo controle positivo (159,00 ua) foram significativamente superiores ao observado no grupo controle negativo (25,15 ua). Entretanto, quando comparados entre si, os grupos experimentais não mostraram diferença significativa, mas, quando comparados ao grupo controle positivo, mostraram índices de dano significativamente inferiores.

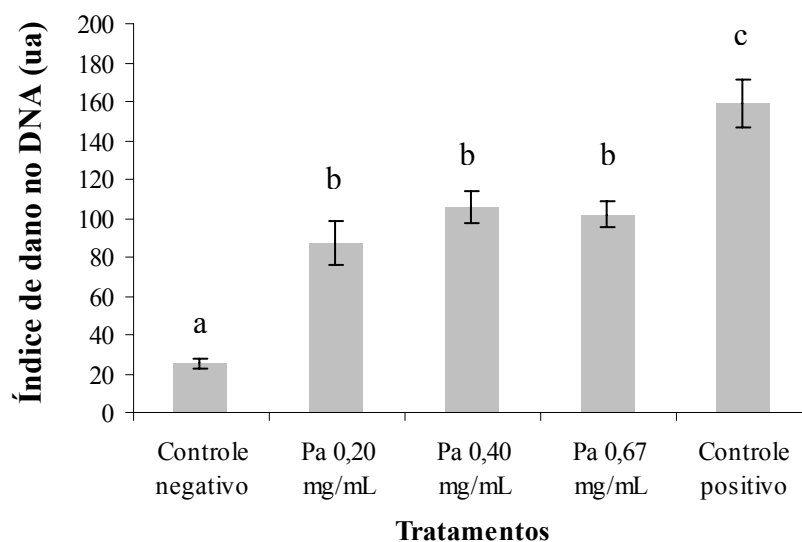


Figura 11. Índice de dano no DNA em células HSG após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas. Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

Quando se considera a quantidade de DNA fragmentado na cauda dos cometas (Figura 12), as células HSG tratadas com extrato de *P. aquilinum* nas concentrações de 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67 mg/mL apresentaram percentuais médios de DNA fragmentado superiores (9,67%; 13,70% e 11,74%, respectivamente) ao verificado no controle negativo (5,14%), embora a análise estatística não tenha evidenciado diferença significativa entre os eles. Contudo, quando comparadas ao controle positivo, as células tratadas com o extrato nas duas maiores concentrações apresentaram percentuais médios de fragmentação do DNA na cauda estatisticamente equivalentes ao do grupo controle positivo (28,73%).

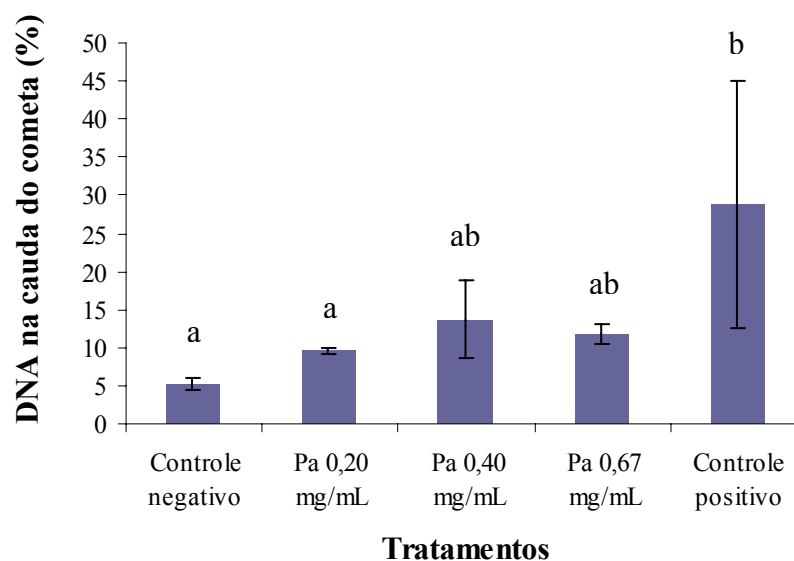


Figura 12. Percentual de DNA fragmentado de células HSG após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas (dados obtidos com o programa CASP). Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

4.2.2- Células OSCC-3

As Figuras 13, 14 e 15 ilustram os resultados obtidos com as células OSCC-3 quanto à, respectivamente, frequência de células com dano no DNA, índice de dano no DNA e percentual médio de DNA na cauda do cometa, calculado pelo programa *CASP*.

As frequências de células com dano no DNA foram significativamente superiores nos grupos tratados com 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67 mg/mL de extrato (20,09%; 20,91% e 58,20% respectivamente) e no controle positivo (26,29%) quando comparadas à verificada no controle negativo (6,7%). Ressalta-se que o tratamento com o extrato na concentração de 0,67 mg/mL induziu uma frequência de dano significativamente superior à induzida pelos demais tratamentos, superior, inclusive que a verificada no grupo controle positivo.

Para as células OSCC-3, também, os índices de dano no DNA apresentados pelos grupos experimentais nas concentrações de 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67 mg/mL (52,76 ua; 47,11 ua e 142,28 ua; respectivamente) e pelo controle positivo (76,52 ua), foram significativamente superiores ao observado no grupo controle negativo (12,94 ua). Entretanto, ao contrário do verificado para as células HSG, em que todos os grupos experimentais se comportaram de maneira similar, para as células OSCC-3, o tratamento com o extrato na concentração de 0,67 mg/mL foi o que induziu o maior índice de dano ao DNA, maior, inclusive, que o observado no controle positivo.

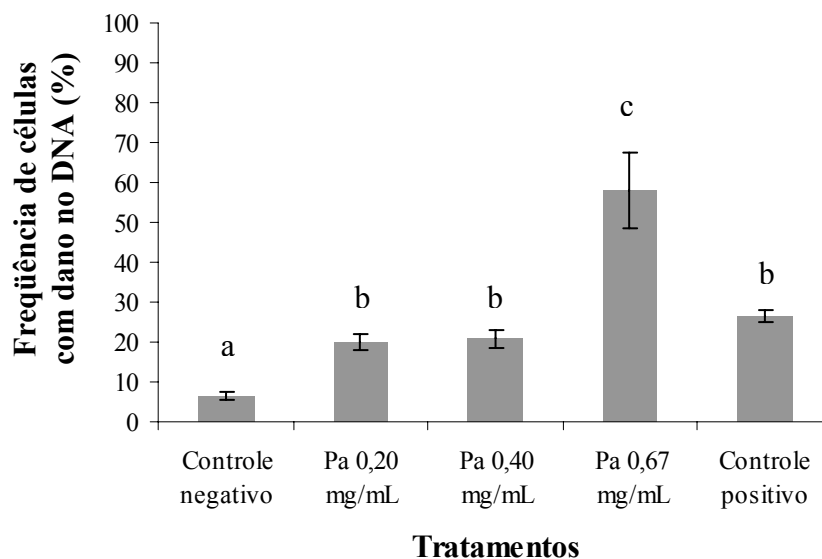


Figura 13. Freqüência de células OSCC-3 com dano no DNA após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas. Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

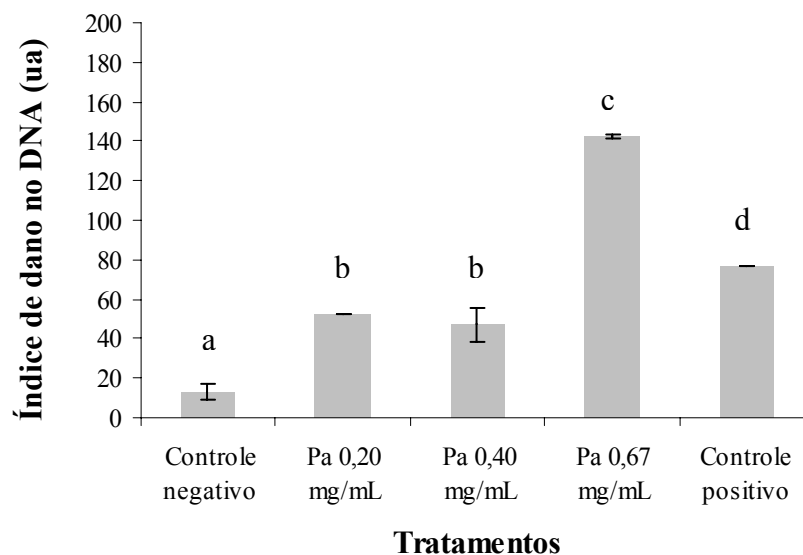


Figura 14. Índice de dano no DNA em células OSCC-3 após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas. Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

Os valores percentuais médios de DNA fragmentado nas células OSCC-3 tratadas com 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67 mg/mL de extrato (12,75%; 8,81% e 19,39%, respectivamente) foram maiores do que no controle negativo (4,45%) (Figura 15). Entretanto, estatisticamente, o grupo tratado com 0,40 mg/mL não se mostrou diferente do controle negativo. Ainda, curiosamente, o controle positivo (11,34%) comportou-se como os demais grupos.

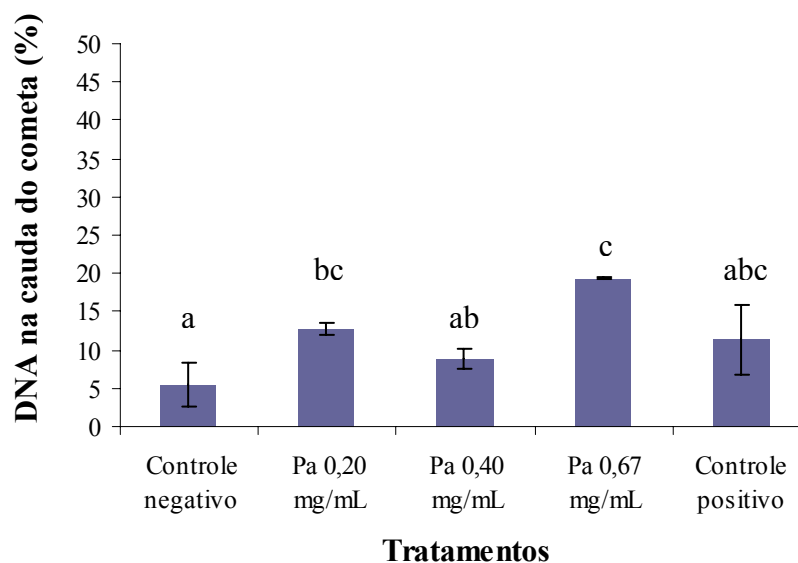


Figura 15. Percentual de DNA fragmentado de células OSCC-3 após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas (dados obtidos com o programa CASP). Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

4.3 – Análise de danos ao DNA de células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato de *P. aquilinum* por meio do ensaio de fragmentação do DNA - “DNA ladder”

De modo a avaliar se efeito do tratamento com o extrato de *P. aquilinum* sobre a integridade do DNA total das células HSG e OSCC-3 está relacionado à indução de apoptose, foi realizado o ensaio de *DNA ladder*. Entretanto, conforme mostrado na Figura 16, essa técnica não demonstrou, nas células HSG nem nas OSCC-3, a fragmentação do DNA em padrão de escada, característica típica de apoptose.

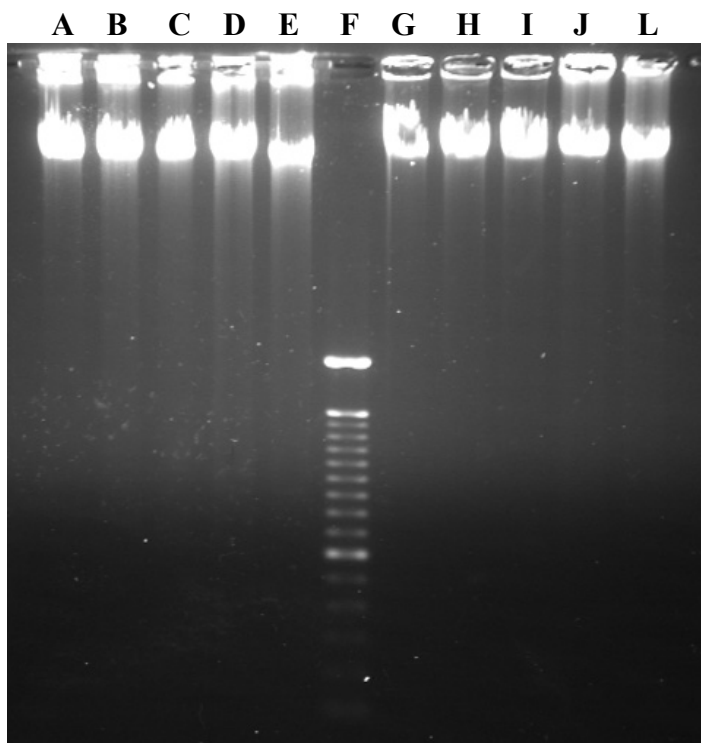


Figura 16. Análise em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo do DNA total extraído de células HSG e OSCC-3 tratadas com diferentes concentrações do extrato de *P. aquilinum*: (A) HSG controle negativo, (B) HSG controle positivo (H_2O_2), (C) HSG - 0,67 mg/mL, (D) HSG - 0,40 mg/mL, (E) HSG - 0,20 mg/mL, (F) marcador de massa molecular de 100 pb, (G) OSCC-3 controle negativo, (H) OSCC-3 controle positivo (H_2O_2), (I) OSCC-3 - 0,67mg/mL, (J) OSCC-3 - 0,40 mg/mL e (L) OSCC-3 - 0,20 mg/mL.

4.4 - Análise da morfologia das células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum*

A análise da morfologia das células HSG e OSCC-3 foi feita com base em alterações observadas em relação aos grupos controle negativo.

4.4.1 - Microscopia de luz

As células HSG (Figura 17 A e B) e OSCC-3 (Figura 18 A e B), ao microscópio de luz, normalmente apresentam morfologias semelhantes. Ambas apresentam forma poligonal, que pode variar de um pouco alongada a mais arredonda de acordo com a confluência da cultura. Apresentam projeções citoplasmáticas, que ligam uma célula à outra. O núcleo dessas

células é esférico ou ovóide, com cromatina fina e ligeiramente granular. Um ou mais nucléolos são evidentes. O citossol tem aspecto relativamente homogêneo, podendo apresentar algumas densidades citoplasmáticas. As células HSG e OSCC-3 que receberam o tratamento com 0,20 mg/mL de extrato não se mostraram diferentes das células dos grupos controle negativo.

Entretanto, as células HSG e OSCC-3 tratadas com o extrato de *P. aquilinum* na concentração de 0,67 mg/mL apresentaram alterações morfológicas e essas foram semelhantes em ambos tipos celulares, conforme ilustrado nas Figuras 17 B-F e 18 B-F, respectivamente. Observou-se a redução do volume celular, principalmente do citoplasma. Algumas células adquiriram forma esférica e demonstraram picnose nuclear (Figuras 17D e F). Outras permaneceram ligadas umas às outras criando o aspecto de cordões de células retraídas (Figura 17D) ou evidenciando os espaços entre elas (Figura 17F e 18C). O formato de muitas células tornou-se irregular e apareceram, no citoplasma, vacúolos de tamanho e quantidade variados (Figuras 17C, 18D e 18F). Observaram-se também muitos restos celulares espalhados pela lâmina (Figuras 17E e 18E). As alterações descritas acima foram encontradas em aproximadamente 25% das células analisadas.

O tratamento com a concentração de 0,40 mg/mL, provocou alterações semelhantes às observadas no tratamento com 0,67 mg/mL de extrato, porém essas foram menos freqüentes.

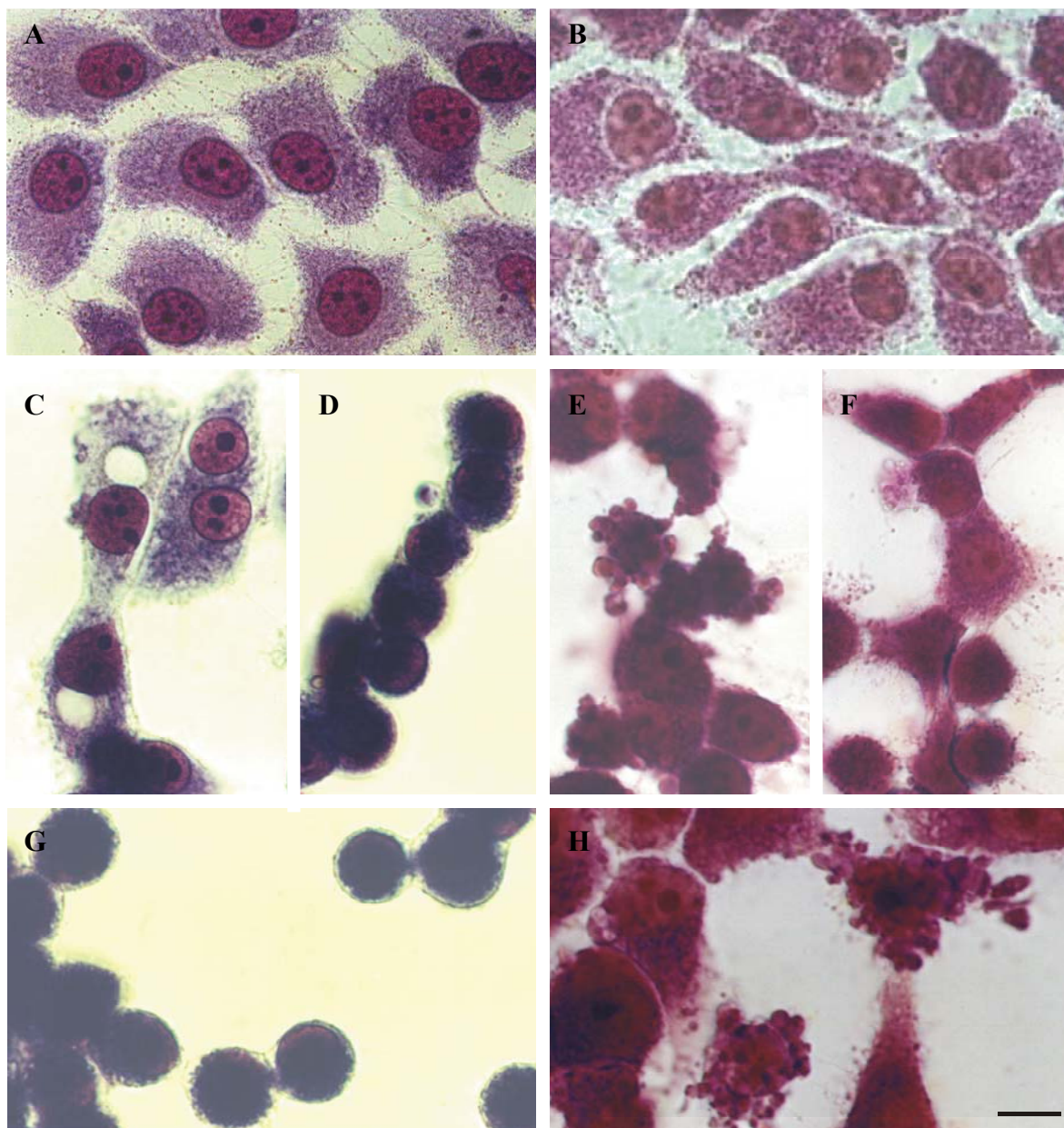


Figura 17. Fotomicrografias de células HSG tratadas com o extrato de *P. aquilinum*. (A e B) Grupo controle negativo. (C, D, E e F) Grupo tratado com o extrato de *P. aquilinum* a 0,67 mg/mL. (G e H) Grupo controle positivo, tratado com peróxido de hidrogênio. (A, C, D e G) Coloração com Giemsa. (B, E, F e H) Coloração com violeta de cresilo. Barra de tamanho = 10 μ m.

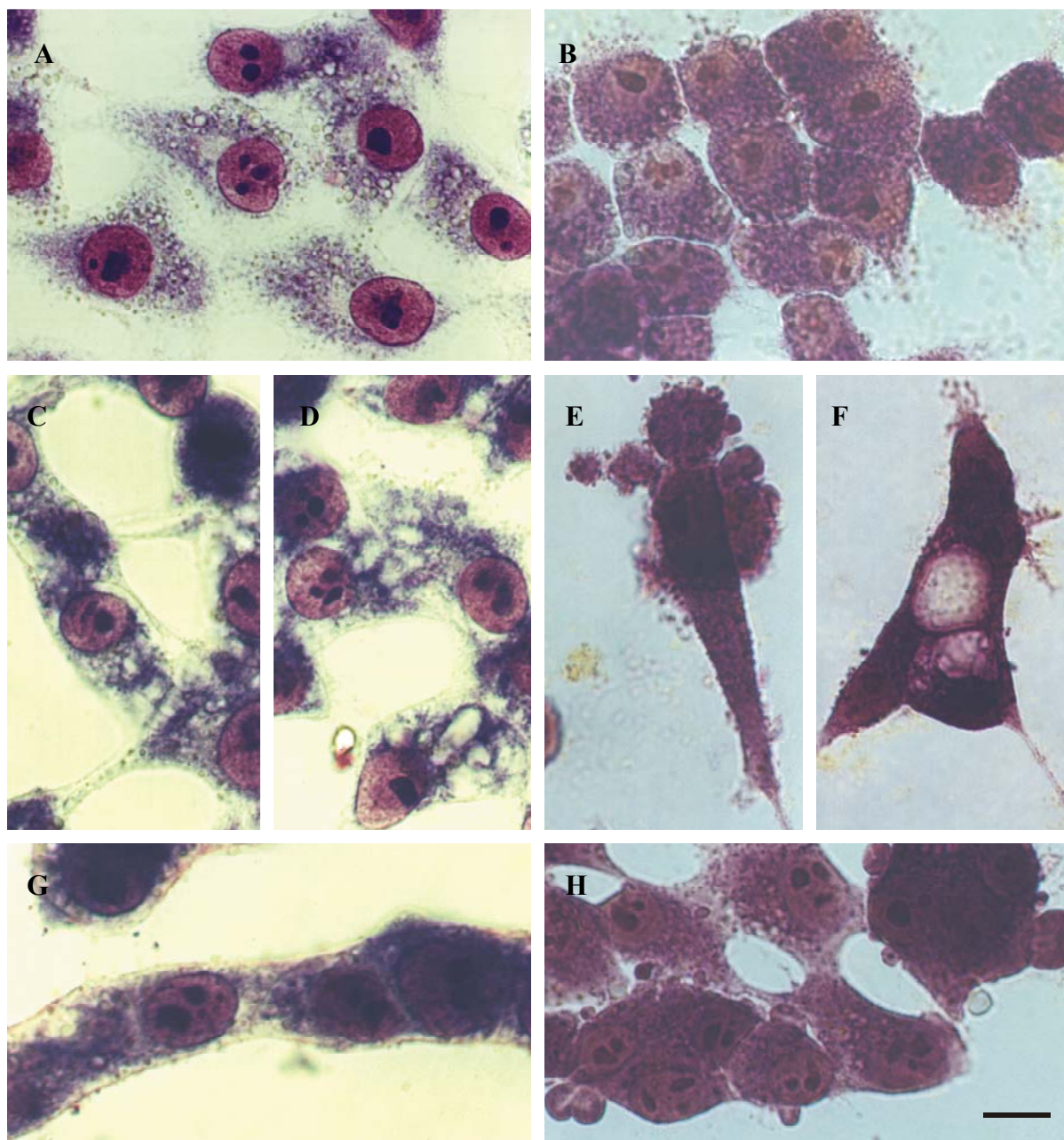


Figura 18. Fotomicrografias de células OSCC-3 tratadas com o extrato de *P. aquilinum*. (A e B) Grupo controle negativo. (C, D, E e F) Grupo tratado com o extrato de *P. aquilinum* a 0,67 mg/mL. (G e H) Grupo controle positivo, tratado com peróxido de hidrogênio. (A, C, D e G) Coloração com Giemsa. (B, E, F e H) Coloração com violeta de cresilo. Barra de tamanho = 10 μ m.

4.3.2 - Microscopia eletrônica de transmissão

Uma vez que as alterações morfológicas apresentadas pelas células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato de *P. aquilinum* nas três diferentes concentrações tiveram variações apenas quantitativas, a análise ultraestrutural que se segue limitou-se, ao grupo tratado com a maior concentração de extrato.

As células HSG e OSCC-3 apresentam ultraestrutura muito similar, que, portanto, foi descrita conjuntamente (Figuras 19A e 20A). Essas células possuem forma irregular e numerosas projeções citoplasmáticas. Seus citoplasmas são ricos em organelas membranosas, mantendo o padrão ultraestrutural característico de células epiteliais. Comumente também são observados grânulos eletrodensos no citoplasma. O núcleo é volumoso e é alta a proporção núcleo/citoplasma. Uma diferença marcante entre esses dois tipos celulares é o fato de as células HSG, que têm origem glandular, apresentarem freqüentemente vesículas de secreção.

Após o tratamento com o extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum*, as células apresentaram várias alterações características da degeneração celular por apoptose (Figuras 19B-E e 20B-E). A cromatina passou a exibir freqüentemente condensações atípicas, formando aglomerados irregulares (Figuras 19B e 20B). Em algumas células, constatou-se a ruptura do envoltório nuclear, evidenciada pela presença de organelas citoplasmáticas dentro dos limites nucleares (Figuras 19B e 20B). Comumente, também se verificou a redução do número de projeções citoplasmáticas, aumento do número de organelas membranosas e presença de numerosos vacúolos no citoplasma, provavelmente formados pelo intumescimento das mitocôndrias (Figuras 19C e 20C-D). Os vacúolos formados nas células OSCC-3 mostraram-se muito volumosos (Fig. 19D). Nas células em fase mais avançada de degeneração celular, foi observada a formação de numerosos corpos apoptóticos (Figuras 19D e 20E). Também se observaram, após o tratamento, células com aspecto necrótico, ou seja, apresentando estruturas celulares em degradação entre porções de cromatina dispersas no citoplasma (Figura 19E).

Algumas das alterações observadas nas células tratadas com o extrato, como perda das projeções citoplasmáticas, presença de condensações atípicas da cromatina, intumescimento das mitocôndrias e presença de vacúolos, foram semelhantes às observadas nas células do grupo controle positivo, tratadas com peróxido de hidrogênio (Figuras 19F e 20F).

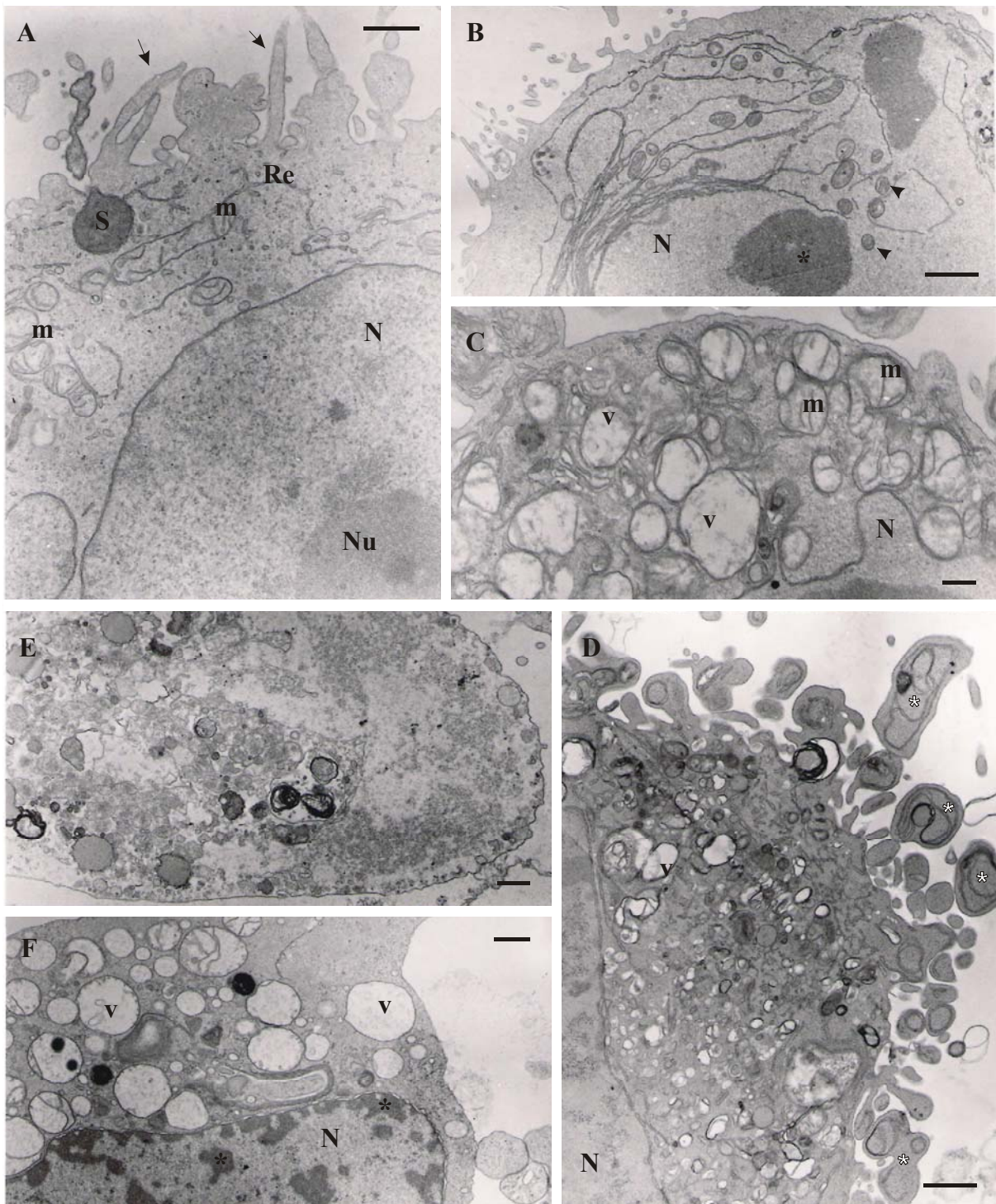


Figura 19. Eletromicrografia de transmissão de células HSG tratadas com o extrato de *P. aquilinum*. (A) Grupo controle negativo. Na célula evidencia-se o núcleo (N), um nucléolo (Nu) e organelas citoplasmáticas, destacando-se mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (Re), vesícula de secreção (S) e projeções citoplasmáticas (setas). (B-E) Grupo tratado com o extrato de *P. aquilinum*. Condensações atípicas da cromatina (*), aumento de organelas membranosas, numerosos vacúolos (v), ruptura do envoltório nuclear evidenciada por organelas nos limites do núcleo (▶) e formação de corpos apoptóticos (*) são observados. (E) Célula em necrose. (F) Célula do grupo controle positivo, tratada com peróxido de hidrogênio. Observa-se perda de projeções citoplasmáticas, condensações atípicas da cromatina (*) e formação de numerosos vacúolos (v). Barra de tamanho = 1 μm

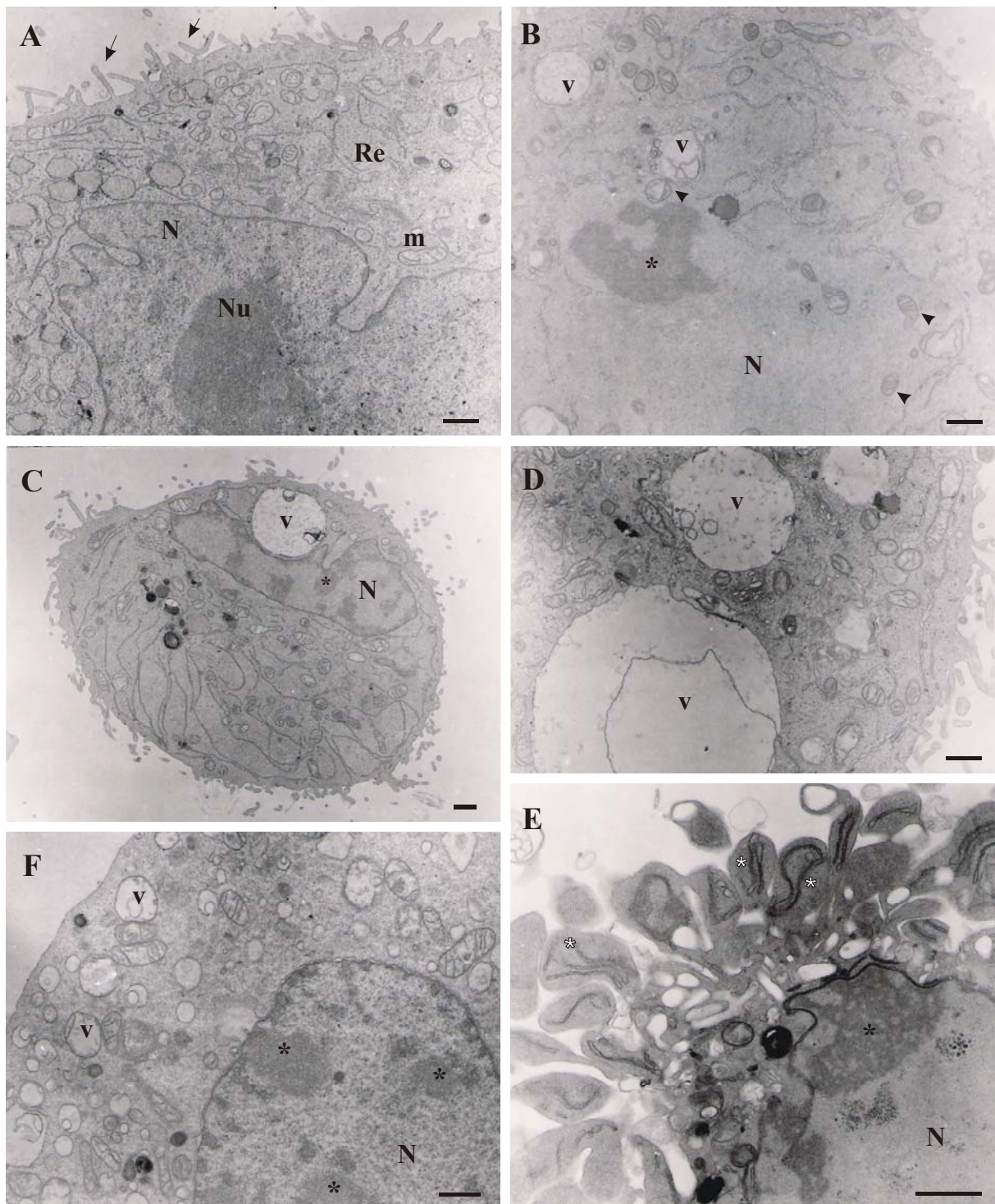


Figura 20. Eletromicrografia de transmissão de células OSCC-3 tratadas com o extrato de *P. aquilinum*. (A) Grupo controle negativo. Na célula evidencia-se o núcleo (N), um nucléolo (Nu) e organelas citoplasmáticas, destacando-se mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (Re) e projeções citoplasmáticas (setas). (B-E) Grupo tratado com o extrato de *P. aquilinum*. Condensações atípicas da cromatina (*), aumento de organelas membranosas, numerosos vacúolos (v), sendo alguns muito volumosos, ruptura do envoltório nuclear evidenciada por organelas nos limites do núcleo (▶) e formação de corpos apoptóticos (*) são observados. (F) Célula do grupo controle positivo, tratada com peróxido de hidrogênio. Observa-se perda de projeções citoplasmáticas, condensações atípicas da cromatina (*) e formação de numerosos vacúolos (v). Barra de tamanho = 1 μm

4.5 – Distinção entre as vias de degeneração das células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum* por meio do ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo

O ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo permitiu a distinção entre células viáveis, necróticas e apoptóticas, em cada um dos grupos experimentais.

As células HSG (Figura 21A-D) e OSCC-3 (Figura 21E-H) consideradas viáveis, tratadas ou não, se apresentavam, em aumento total de 400X, de coloração verde, com forma esférica ou ovóide regular e sem projeções citoplasmáticas (Figuras 21A e 21E). As que eram consideradas apoptóticas apresentavam alterações morfológicas como condensação e/ou fragmentação da cromatina e liberação de corpos apoptóticos, podendo se mostrar coradas em verde ou vermelho. Entretanto nos grupos de células HSG (Figura 21B e 21C) e OSCC-3 (Figura 21F e 21G) tratadas com extrato de *P. aquilinum*, havia também outras alterações, como presença de vacúolos no citoplasma e corpos apoptóticos que mais se assemelhavam a grandes projeções citoplasmáticas irregulares. Na Figura 21G, pode-se observar uma célula OSCC-3 de cor vermelha, com condensação da cromatina e projeções citoplasmáticas típicas de uma célula em fase tardia da apoptose. As Figuras 21D e 21H mostram células HSG e OSCC-3, respectivamente, do grupo controle positivo apresentando coloração verde e liberando corpos apoptóticos.

Células em processo de necrose também foram visualizadas nesse experimento, como ilustrado na Figura 21D.

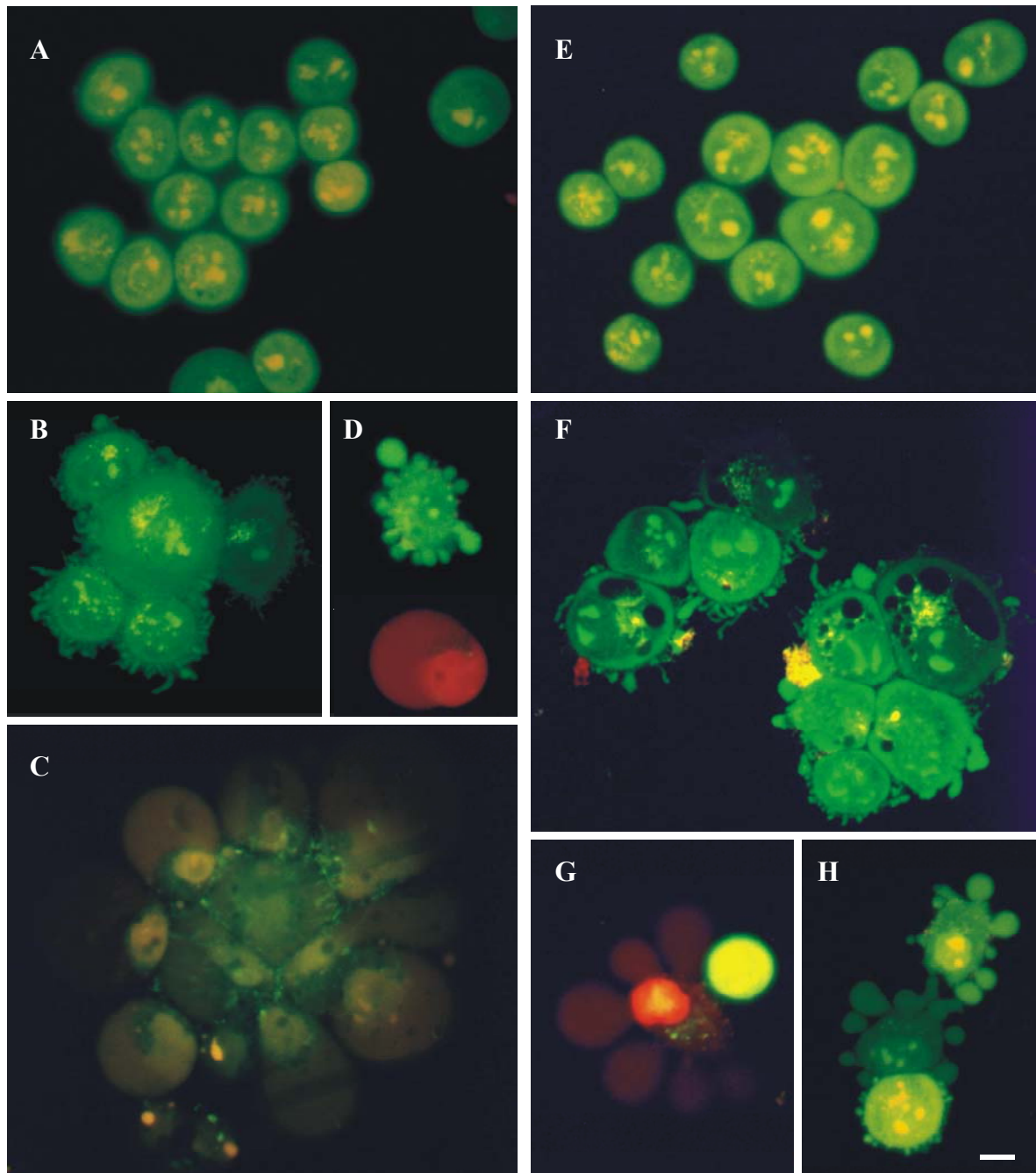


Figura 21. Fotomicrografias de fluorescência de células HSG (A - D) e OSCC-3 (E - H) tratadas com o extrato de *P. aquilinum* e coradas com alarajado de acridina e brometo de etídeo. (A e E) Grupo controle negativo. (B, C, F e G) Grupo tratado com 0,67 mg/mL do extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum*. (D e H) Grupo controle positivo, tratado com peróxido de hidrogênio. Barra de tamanho = 10 μ m

O ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo permitiu quantificar célula HSG e OSCC-3 viáveis, necróticas e apoptóticas, em cada um dos grupos experimentais e os resultados estão apresentados nas Figuras 22 e 23.

4.5.1- Células HSG

Como se pode observar na Figura 22, apenas o tratamento com extrato de *P. aquilinum* na concentração de 0,40 mg/mL induziu as células HSG a um processo de degeneração (23,02%) significativamente maior que o valor apresentado no grupo controle negativo (10,81%). Os tratamentos com extrato de *P. aquilinum* nas concentrações 0,20 mg/mL e 0,67 mg/mL induziram taxas de degeneração celular (12,48% e 16,04%, respectivamente) superiores à observada no controle negativo, porém essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa.

Além da avaliação da frequência de células em degeneração após cada tratamento, esse ensaio permitiu a identificação da via de degeneração, distinguindo as células apoptóticas das necróticas. Conforme mostra a Figura 22, em todos os tratamentos, a via de degeneração mais frequente foi a apoptose.

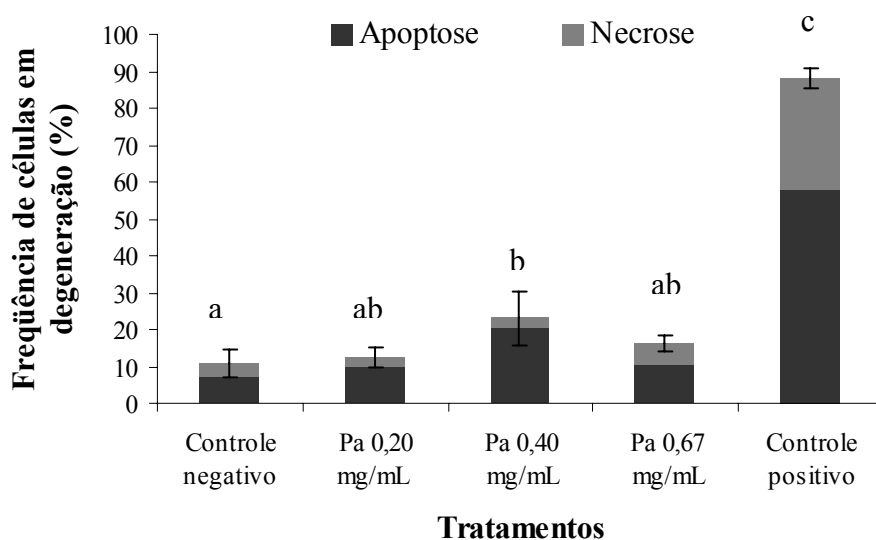


Figura 22. Frequência de células HSG em degeneração após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas. Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

4.5.2- Células OSCC-3

Assim como as células HSG, as OSCC-3 também foram avaliadas em relação à degeneração celular. No entanto essas se mostraram mais suscetíveis aos tratamentos.

Como ilustra a Figura 23, as culturas de OSCC-3 tratadas com o extrato de *P. aquilinum* nas concentrações de 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67 mg/mL apresentaram freqüências de células em degeneração (26,73%; 54,04% e 23,49%, respectivamente) significativamente superiores à apresentada pelo grupo controle negativo (9,89%). Vale ressaltar, porém, que, entre os grupos tratados com extrato, a concentração intermediária foi a que induziu uma maior freqüência de células em degeneração.

Pode-se observar também que, assim como verificado nas células HSG, a via de degeneração mais freqüente nas OSCC-3 foi a apoptose.

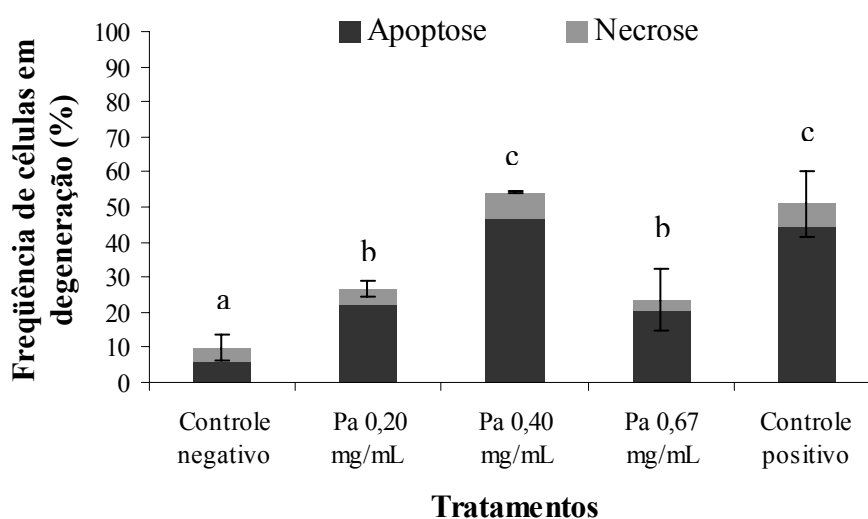


Figura 23. Frequência de células OSCC-3 em degeneração após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas. Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

4.6 – Detecção de apoptose nas células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato de *P. aquilinum* por meio do ensaio de TUNEL

Visando a um refinamento na quantificação da ocorrência da apoptose, realizou-se o ensaio de TUNEL, cujos resultados foram avaliados por duas metodologias: i) análise visual e ii) citometria de fluxo.

4.6.1- Células HSG

As Figuras 24 e 25 ilustram as freqüências de células HSG em apoptose obtidas por meio de análise visual e citometria de fluxo, respectivamente.

Os resultados obtidos por meio da análise visual (Figura 24) mostram que os grupos tratados com extrato de *P. aquilinum* nas concentrações de 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67mg/mL apresentaram freqüências de células em apoptose (13,97%; 14,45% e 69,50%, respectivamente) significativamente superiores à apresentada pelo grupo controle negativo (1,66%). Entre os grupos tratados, as duas concentrações mais baixas induziram freqüências de células em apoptose estatisticamente equivalentes entre si.

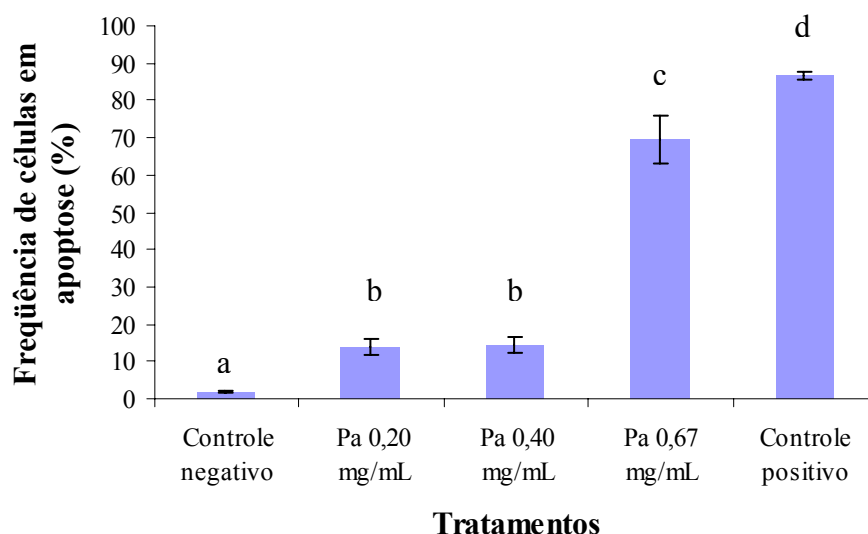


Figura 24. Freqüência de células HSG em apoptose após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas (dados obtidos por análise visual do ensaio de TUNEL). Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

De acordo com a Figura 25, que ilustra os resultados obtidos por citometria de fluxo, os grupos tratados com extrato de *P. aquilinum* nas concentrações de 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67mg/mL embora apresentassem freqüências de células em apoptose (19,96%; 12,66% e

58,20%, respectivamente) superiores à do grupo controle negativo (10,98%), somente a concentração de 0,67mg/mL mostrou-se estatisticamente diferente do controle negativo.

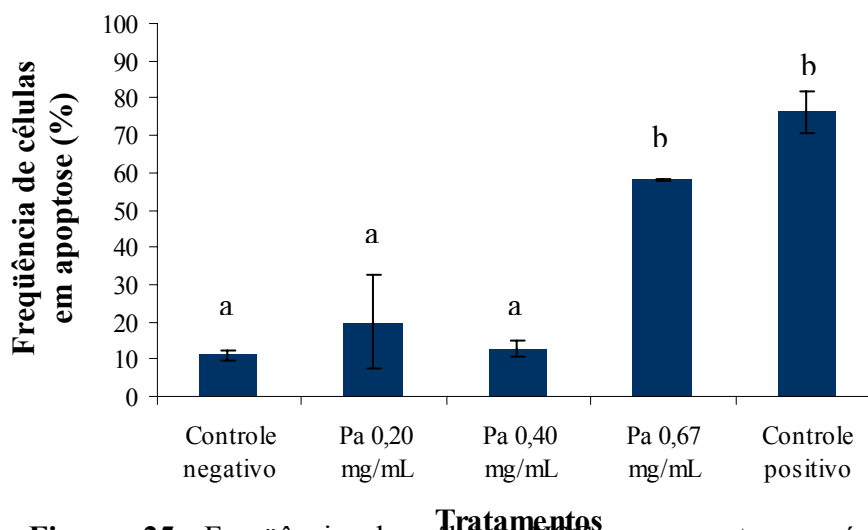


Figura 25. Frequência de células HSG em apoptose após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas (dados obtidos, por citometria de fluxo, no ensaio de TUNEL). Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

4.6.2- Células OSCC-3

As Figuras 26 e 27 ilustram as frequências de células OSCC-3 em apoptose obtidas por meio de análise visual e citometria de fluxo, respectivamente.

Considerando a frequência de células apoptóticas observadas por meio da análise visual, os resultados obtidos para os grupos tratados com extrato de *P. aquilinum* nas concentrações de 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67mg/mL (46,28%; 36,48% e 48,60%, respectivamente) foram significativamente superiores à apresentada pelo grupo controle negativo (21,13%). Entre os grupos experimentais, os submetidos ao tratamento com as concentrações de 0,20 mg/mL e 0,67mg/mL apresentaram frequências de células em apoptose estatisticamente equivalentes entre si e superiores à apresentada pelo grupo tratado com o extrato na concentração 0,40 mg/mL.

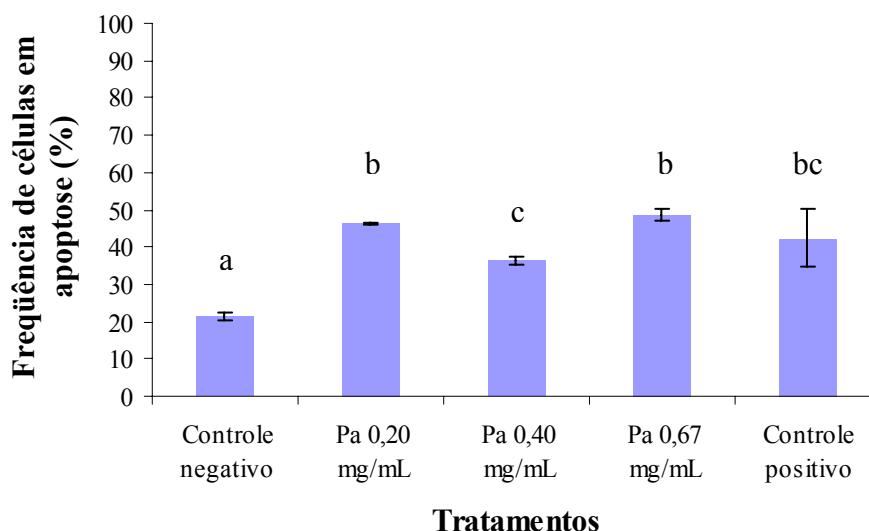


Figura 26. Frequência de células OSCC-3 em apoptose após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas (dados obtidos por análise visual do ensaio de TUNEL). Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

A análise por meio da citometria de fluxo mostrou resultados semelhantes aos obtidos com a análise visual. Desse modo, as frequências de células apoptóticas observadas nos grupos tratados com extrato de *P. aquilinum* nas concentrações de 0,20 mg/mL; 0,40 mg/mL e 0,67mg/mL (47,82%; 33,36% e 58,53%, respectivamente) foram significativamente superiores à apresentada pelo grupo controle negativo (18,64%). Além disso, entre os grupos tratados com extrato de *P. aquilinum*, da mesma forma que o verificado por meio da análise visual, as concentrações de 0,20 mg/mL e 0,67mg/mL induziram frequências de células em apoptose estatisticamente equivalentes entre si e superiores à induzida pela concentração de 0,40 mg/mL.

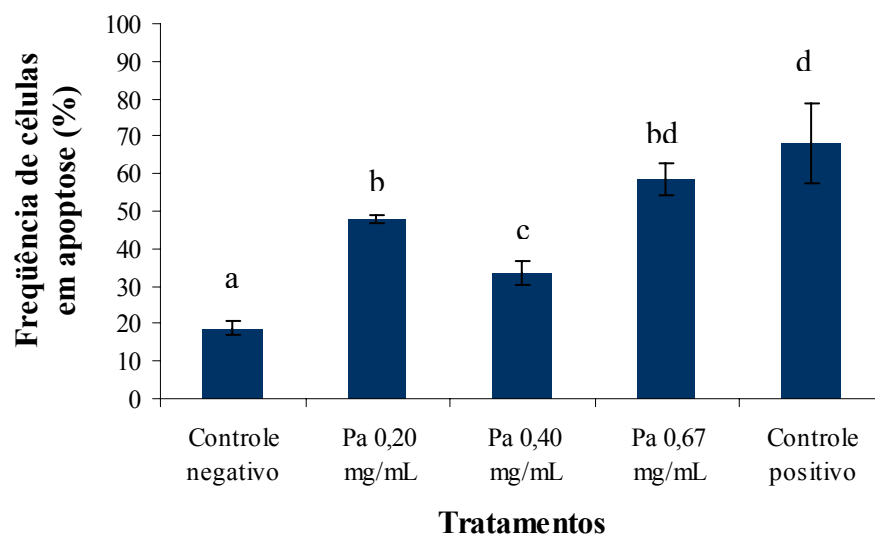


Figura 27. Frequência de células OSCC-3 em apoptose após tratamento com o extrato de *P. aquilinum* (Pa) em diferentes concentrações durante 48 horas (dados obtidos, por citometria de fluxo, no ensaio de TUNEL). Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$)

5. Discussão

A samambaia *Pteridium aquilinum* é considerada uma das plantas tóxicas mais importantes, não só por sua extensa distribuição geográfica, mas também por provocar, nas diferentes espécies animais que a utilizam como alimento, severos quadros de intoxicação e o desenvolvimento de tumores nos trato digestório e urinário. Além disso, estudos epidemiológicos têm relacionado a alta incidência de câncer de esôfago e estômago em populações humanas à utilização da samambaia na alimentação e à exposição indireta aos seus carcinógenos, como pela aspiração de seus esporos e pela ingestão de leite de vacas que se alimentaram da planta ou de água contaminada por tais compostos.

Desde o reconhecimento da toxicidade e carcinogenicidade da samambaia, em estudos que datam da década de sessenta do século XX, muitos estudos têm buscado reproduzir experimentalmente seus efeitos de modo a elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade e carcinogenicidade induzidas pela planta.

Nesse sentido, visando a um melhor entendimento dos mecanismos de toxicidade induzida por essa samambaia, este estudo teve como objetivo avaliar seus possíveis efeitos genotóxicos e citotóxicos sobre duas linhagens de células humanas: uma de glândula submandibular (HSG) e outra de epitélio bucal (OSCC-3). Desse modo essas linhagens celulares foram tratadas com um extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum*, cuja concentração e tempo de tratamento foram definidos a partir do teste de viabilidade celular realizado por exclusão do corante vital azul de tripano. A utilização do extrato aquoso não fracionado justifica-se pelo fato de Almeida Santos (1999) não ter demonstrado, *in vivo*, diferença entre os efeitos genotóxicos desse extrato e de suas frações. Ademais, a contaminação de aquíferos e do leite, e o consumo da planta como alimento ocorrem na forma não processada.

Neste estudo, a partir do teste de viabilidade, definiu-se que as células seriam submetidas ao tratamento com o extrato na concentração de 0,67 mg/mL por 48 horas, por ter sido esse o que induziu, em ambos tipos celulares, uma redução de aproximadamente 50% na viabilidade celular, sendo essa diferença significativa em relação ao grupo controle negativo (Tabelas 03 e 04). De acordo com a revisão realizada por Eisenbrand *et al.* (2002), quando se visa analisar *in vitro* os efeitos genotóxicos de um composto, a concentração a ser utilizada em um tratamento deve ser definida em teste de citotoxicidade. Dessa forma, estabelecendo a dose a ser utilizada como a que afeta 50% das células, é possível comparar quantitativamente as respostas de um único composto em diferentes sistemas ou de vários compostos em um só sistema. Contudo, em estudos de genotoxicidade, é necessário avaliar os possíveis efeitos de doses mais baixas do que a citotóxica, uma vez que podem ocorrer danos ao material genético, sem necessariamente afetar a viabilidade celular, como discutido por Kirkland e

Muller (2000). Assim sendo, neste estudo, optou-se também por realizar o tratamento com outras duas concentrações do extrato que correspondem a 30% e 60% da primeira (0,20 e 0,40 mg/mL, respectivamente), com o objetivo de estudar também possíveis efeitos dependentes da dose administrada.

Apesar de o teste de viabilidade ter evidenciado uma diminuição geral no número de células viáveis após tratamento com o extrato de *P. aquilinum*, verificou-se que, em certos pontos experimentais, houve aumento do número de células viáveis. Conforme o teste estatístico realizado, os tratamentos que provocaram esse aumento nas células HSG foi o realizado com extrato na concentração de 0,67 mg/mL por 8 horas e, nas células OSCC-3, com as concentrações de 0,34 mg/mL por 12 horas, de 0,67 mg/mL por 4, 12 e 24 horas e de 1,34 mg/mL por 12 horas. Considerando que o ciclo celular dessas linhagens é de, aproximadamente, 12 horas, é possível que, em alguns tratamentos por intervalos iguais ou superiores, o aumento na viabilidade celular reflita um efeito mitogênico do extrato. Resultados similares a esse foram obtidos por Almeida Santos (1999), que, ao avaliar os efeitos genotóxicos do extrato da samambaia, *in vivo*, demonstrou que ele induziu a proliferação de macrófagos peritoneais de camundongos. É importante ressaltar que macrófagos, por serem células diferenciadas, só entram em mitose frente a um estímulo imunogênico. Janz e Shacter (1991) obtiveram resultados semelhantes tratando linhagens de queratinócitos murinos com doses de pristano, um isoalcano com potencial carcinogênico. Eles observaram que, apesar de essa substância ser citotóxica, em algumas linhagens, certas doses induziram efeito mitogênico. Segundo esses autores, esse efeito pode estar relacionado ao fato de essa substância ser mutagênica e, por conseguinte, poder afetar genes do ciclo celular.

As Figuras 08 e 09, que ilustram os dados das Tabelas 03 e 04 mostram, em todos os grupos experimentais, aumento no número de células HSG e OSCC-3 viáveis entre 24 e 48 horas. Esse aumento nos grupos tratados pode refletir a seleção clonal de células que não sofreram os efeitos citotóxicos do extrato.

De acordo com Gallmeier *et al.* (2005), a ICH (*The International Conference for Harmonization*) estabeleceu, para a avaliação da genotoxicidade de substâncias, diretrizes que determinam a realização de três testes: verificação da mutagenicidade em bactérias, ensaios de detecção de aberrações cromossômicas em células hematopoiéticas de roedores *in vivo* e em células de mamíferos *in vitro*. Entre os testes de detecção de aberrações cromossômicas, o estudo citogenético é classicamente utilizado porque, pela observação direta dos cromossomos, permite a quantificação das alterações e a distinção entre os tipos de alterações (estruturais ou numéricas). Entretanto características intrínsecas do tipos celulares

empregados no presente estudo inviabilizaram a realização desse teste. Conforme verificado por Campos da Paz (2005), as linhagens celulares HSG e OSCC-3, provavelmente por serem de origem tumoral, apresentam elevada instabilidade cromossômica. Seus cromossomos têm número, tamanho e morfologia muito diferentes do cariótipo humano normal, o que dificulta a distinção entre as alterações genéticas intrínsecas e as provocadas por um tratamento experimental.

Assim sendo, neste estudo, a avaliação do dano genético provocado pelo extrato de *P. aquilinum* foi realizada por meio do ensaio cometa. Esse ensaio tem sido considerado um dos melhores métodos para quantificar o dano ao DNA, pois, apesar de simples, possui grande sensibilidade, permitindo mensurar não somente quebras de fita dupla, mas também de fita simples, além de sítios suscetíveis a ataques alcalinos, dano oxidativo ao DNA e ligações cruzadas de DNA (Singh *et al.*, 1988; Horoz *et al.*, 2006).

A avaliação dos resultados obtidos no ensaio cometa pode ser feita de duas maneiras: i) por meio da análise visual, conforme descrito por Jalonszynski *et al.* (1997), calculando-se uma média ponderada para cinco classes distintas de cometas classificados segundo o grau de fragmentação do DNA ou ii) por meio de programas de análise de imagem, que quantificam o DNA fragmentado. Neste trabalho, a análise foi feita de ambas formas.

Os resultados do ensaio cometa estão representados nas Figuras 10 a 12 (células HSG) e 13 a 15 (células OSCC-3). Nesse ensaio, os grupos controle negativo das células HSG e OSCC-3 mostraram frequências basais de células com dano de 12,84% e 6,70%, respectivamente, e índices de dano basais de 25,15 ua e 12,94 ua, respectivamente. O fato de esses parâmetros serem maiores em HSG do que em OSCC-3, demonstra maior instabilidade genética intrínseca daquele tipo celular, ao contrário do observado por Campos da Paz (2005), que demonstrou maior instabilidade intrínseca nas células OSCC-3 quando comparadas com HSG. Essas diferenças obtidas nesses dois estudos podem ser conseqüências da instabilidade genética de ambos tipos celulares, que têm origem tumoral (revisto por Michor *et al.*, 2005 e Sieber *et al.*, 2005).

Nos grupos de células HSG e OSCC-3 tratados com extrato da samambaia, os valores de FD e ID foram significativamente superiores aos observados nos controles negativos. Nas células HSG, as três concentrações induziram valores de FD e ID estatisticamente equivalentes, mostrando que o dano provocado não foi dependente da dose administrada (Figuras 10 e 11). Diferentemente, o tratamento das células OSCC-3 com a concentração mais elevada de extrato levou a FD e ID estatisticamente superiores aos verificados para as duas doses mais baixas, que foram equivalentes entre si (Figuras 13 e 14). Essas diferenças podem estar relacionadas a uma maior sensibilidade das células HSG ao tratamento.

Os resultados obtidos quanto a FD e ID para as células HSG e OSCC-3 estão de acordo com os relatos que apontam a samambaia e seus compostos como mutagênicos (Nagao *et al.*, 1989; Shahin *et al.*, 1998) e clastogênicos. Almeida-Santos (1999) demonstrou que as frações hexânica, etanólica e aquosa do extrato de *P. aquilinum* induziram quebras no DNA de células de medula óssea e de peritônio de camundongos, sendo que estas últimas se mostraram mais suscetíveis ao potencial clastogênico da planta. Moura *et al.* (1988) também demonstraram a clastogenicidade da planta ao descreverem uma maior incidência de aberrações cromossômicas estruturais em linfócitos de vacas que se alimentavam habitualmente da samambaia, quando comparados aos de outras que pastavam em regiões onde a planta era rara. Da mesma forma, Lioi *et al.* (2004) também verificaram que vacas que se alimentavam da planta apresentavam maior número de aberrações cromossômicas, principalmente quando se evidenciava a infecção com o BPV-2.

O efeito clastogênico de *P. aquilinum* também tem sido comprovado por meio de ensaios *in vitro*. Conforme revisto por Rasmussen (2003), a ptaquilosida, considerado o principal composto tóxico da planta, induziu alterações cromossômicas em linhagens de células de pulmão de hamster bem como no teste de Ames modificado em linhagens de *Salmonella typhimurium*. Pessoas que consumiam habitualmente a planta também apresentaram maior número de alterações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico, quando comparadas àquelas que não a utilizavam na alimentação (Hirayama, 1979). No entanto o único estudo que avaliou a genotoxicidade da samambaia por meio do ensaio cometa foi o realizado por Simán *et al.* (2000), que avaliaram *in vitro* a genotoxicidade de extratos de esporos de várias samambaias, incluindo *P. aquilinum*, sobre uma linhagem de células de leucemia pré-mielóide humana em cultura. Contudo, diferentemente do estudo de Simán *et al.*, este estudo avaliou o extrato total de brotos da planta.

Além da análise visual, este estudo realizou também a análise computacional das imagens obtidas no ensaio cometa, o que permitiu quantificar o DNA fragmentado, ou seja, aquele presente na cauda dos cometas (Figuras 12 e 15). Não obstante as imagens capturadas para a análise por meio do programa CASP terem sido as mesmas analisadas visualmente, seus resultados mostraram-se diferentes. De acordo com esse programa, nas células HSG, os percentuais de DNA fragmentado induzidos pelos diferentes tratamentos não foram estatisticamente diferentes em relação ao controle negativo. Ainda, o tratamento das células OSCC-3 com as concentrações de extrato de 0,20 e 0,67 mg/mL induziu percentuais de fragmentação superiores ao observado no controle negativo. Curiosamente, porém, o tratamento com a concentração intermediária, de 0,40 mg/mL, não se mostrou estatisticamente diferente do controle negativo.

A divergência entre os resultados obtidos por meio das análises visual e computacional pode estar relacionada a limitações do programa na análise de alguns tipos de dano, embora, geralmente, programas como esse permitam quantificar os resultados de maneira mais padronizada e imparcial. Uma das limitações do programa CASP consiste em que, para delimitar os cometas a serem analisados, seu algoritmo assume que os pontos mais intensos estão localizados na cabeça do cometa e que estes estão orientados no sentido da esquerda para a direita da imagem. Desse modo, a partir da delimitação de cabeça e cauda, podem-se encontrar valores para a área da cabeça e para o comprimento e a área da cauda, possibilitando que se estabelecesse uma relação entre eles. Contudo muitos dos cometas formados quando há dano intenso no DNA não costumam ter pontos mais intensos na cabeça e sim na cauda, o que pode conduzir a um erro de interpretação pelo programa CASP. Nesse casos, o programa pode desconsiderar, total ou parcialmente, o comprimento e a área reais da cauda em certos cometas, registrando valores de fragmentação muito inferiores aos reais (Konca *et al.*, 2003). Como, neste estudo, os grupos tratados com extrato de *P. aquilinum* apresentavam muitos nucleóide classificados como cometas de classe 4, que indicam dano intenso, a limitação do programa na análise nesse tipo de dano pode explicar a divergência entre os resultados obtidos por meio das análises visual e computacional. Mesmo sendo essa uma limitação compartilhada por todos os programas empregados especificamente para a análise do ensaio cometa, esses são utilizados freqüentemente na literatura científica, o que justifica seu emprego em nosso trabalho.

Imagens de cometas com dano intenso no DNA, comumente chamadas de “células fantasmas” ou “nuvens de DNA”, muitas vezes são desprezadas em análises de genotoxicidade por serem consideradas por muito autores como indicativos de morte celular, como por apoptose (revisto por Brink *et al.*, 2006). Assim, a análise do ensaio cometa sem a exclusão de tais imagens poderia conduzir a um resultado falso positivo (Hartmann & Speit, 1997). Choucroun *et al.* (2001), avaliando se a ocorrência da apoptose poderia conduzir a resultados falso-positivos no ensaio cometa, demonstraram que quando eram incluídos na análise os cometas de classe 4, havia um aumento nos valores encontrados para os parâmetros de análise do experimento: percentual de DNA na cauda, comprimento e momento da cauda. Não se demonstrou, porém, a coincidência entre o número de cometas de classe 4 e o número de células mortas observadas, que foi bem maior. Esses e outros autores recomendam realizar o ensaio cometa em associação a um teste de viabilidade celular para evitar artefatos na análise (Hartmann & Speit, 1997; Roser *et al.*, 2001). Tendo em vista tal recomendação, realizou-se o ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo, cujos resultados serão discutidos mais adiante.

Como neste estudo foi observada uma grande quantidade de cometas com dano intenso, provavelmente o extrato estaria induzindo também citotoxicidade. Assim sendo, realizou-se inicialmente o ensaio de fragmentação de DNA para verificar se o efeito citotóxico se manifestaria por meio da indução da apoptose.

Sabe-se que um dos fenômenos que mais caracterizam a apoptose é a fragmentação do DNA nuclear em múltiplos fragmentos de 180 a 200 pares de base, visualizados como uma “escada de DNA” em um gel de agarose corado com brometo de etídeo. Segundo Otsuki *et al.* (2003), essa técnica é muito adequada para detectar apoptose induzida em células em cultura, já que, além de ser rápida e de baixo custo, é favorecida pelo fato de que células *in vitro* costumam responder a estímulos letais conjuntamente e de maneira semelhante.

No entanto os resultados obtidos por meio desse ensaio não evidenciaram fragmentação do DNA em nenhum dos grupos experimentais (Figura 16). A literatura tem relatado que esse método apresenta baixa sensibilidade quando a quantidade de células na cultura é inferior a 10^6 . Ainda, para que seja bem visualizada a formação da “escada de DNA” essa técnica requer uma taxa mínima de 20% de células em apoptose (revisto por Otsuki *et al.*, 2003). Mesmo com o aumento do DNA fragmentado na amostra, o ensaio de *DNA ladder* pode não apresentar grande sensibilidade, já que a fragmentação do DNA em padrão de “escada” só é observada quando a extensão da clivagem oligonucleossomal é proeminente, o que ocorre apenas na fase tardia do processo apoptótico (revisto por Yasuhara *et al.*, 2003). É possível que o dano observado no ensaio cometa não reflita a ocorrência da apoptose ou que essa via de morte celular esteja sendo induzida em uma taxa inferior a 20%. Buscou-se, por conseguinte, realizar análises mais refinadas para comprovar se o resultado negativo obtido nesse experimento refletia os verdadeiros efeitos dos tratamentos realizados ou se meramente representava uma limitação de sensibilidade da abordagem experimental. Desse modo, realizou-se a análise morfológica e ultraestrutural das células tratadas com extrato de *P. aquilinum*.

Em microscopia de luz (Figuras 17 e 18), observou-se que aproximadamente 25% das células apresentavam alterações tais como redução do volume celular, forma esférica, picnose nuclear, formação de numerosos vacúolos de tamanhos variados no citoplasma e presença de muitos restos celulares espalhados pela lâmina. Esses achados morfológicos foram semelhantes aos encontrados por Zupanska *et al.* (2005), que demonstraram em células humanas de glioma em cultura que o tratamento com ciclosporina induzia morte celular por apoptose, associada a alterações na morfologia das células, vacuolização do citoplasma e condensação da cromatina. Os resultados obtidos na microscopia de luz sugerem que o

tratamento com extrato da samambaia induziu um processo de apoptose nas células HSG e OSCC-3.

De modo a confirmar o significado das alterações observadas em microscopia de luz, prosseguiu-se à análise ultraestrutural, cujos resultados estão expressos nas Figuras 19 e 20. Após o tratamento com o extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum*, as células apresentaram várias alterações ultraestruturais típicas do processo apoptótico como condensações atípicas na cromatina, formando aglomerados irregulares, ruptura do envoltório nuclear, presença de numerosos vacúolos de tamanhos variados e formação de numerosos corpos apoptóticos. Alterações semelhantes a essas, tais como condensação da cromatina, presença de vacúolos no citoplasma, intumescimento de mitocôndrias, ruptura do envelope nuclear e formação de corpos apoptóticos também foram observados por Carranza-Rosales *et al.* (2005) ao tratarem uma linhagem de células de rim com cloreto de mercúrio, por Lund *et al.* (2002) em monócitos humanos em degeneração sob condições normais de cultura e por Li *et al.* (2003) ao submeterem células de carcinoma de ovário a temperaturas elevadas e à droga antitumoral Carmofur.

Corroborando os resultados deste trabalho, tem-se descrito que um dos primeiros eventos morfológicos observados na apoptose é a condensação da cromatina, embora esta seja geralmente relatada como predominante na periferia nuclear, apresentando o aspecto de meia-lua. Por definição, durante esse processo de degeneração, as organelas se manteriam intactas (revisto por Otsuki *et al.*, 2003), mas trabalhos posteriores têm relatado alterações mitocondriais durante a apoptose, com seu intumescimento e liberação do citocromo c (Vander-Heiden *et al.* 1997, Trincavelli *et al.*, 2003; Bota *et al.*, 2005). Os numerosos vacúolos observados após o tratamento com o extrato da samambaia provavelmente são provocados pelo intumescimento das mitocôndrias, evidenciado na Figura 20C. Segundo Bendotti *et al.* (2001), o intumescimento da mitocôndria sugere alteração na permeabilidade de sua membrana. Esse aumento na permeabilidade é considerado um importante passo na cascata que conduz à degeneração celular e pode ser induzido por meio da ativação do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, com conseqüentes alterações osmóticas mitocondriais. Esses autores discutem ainda que esse evento pode desencadear a ativação da cascata de caspases que conduzem à apoptose. Estudos de Argermüller *et al.* (1998) também contribuem para explicar as alterações na membrana mitocondrial observadas no presente estudo e sua importância nas alterações ultraestruturais observadas nessas organelas durante o processo apoptótico. Esses autores descreveram a ruptura pontual da membrana mitocondrial externa e a protrusão da membrana interna através da abertura formada, produzindo uma hérnia, que representaria uma lesão pré-apoptótica altamente específica.

Além das alterações típicas do processo apoptótico, células tratadas com o extrato apresentavam também aumento no número de organelas membranosas de difícil identificação no citoplasma. Vale ressaltar que, na literatura científica, não há relatos que correlacionem essa alteração ultraestrutural com genotoxicidade ou citotoxicidade.

Alterações morfológicas como condensação da cromatina, presença de vacúolos no citoplasma e formação de corpos apoptóticos foram também observadas no ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo (Figura 21). Neste estudo, todas essas características foram consideradas na análise, embora grande parte dos trabalhos da literatura que utilizam essa técnica considere apenas a coloração e a condensação da cromatina para classificar as células como apoptóticas, necróticas ou viáveis (Kosminder *et al.*, 2004; Wang & Huang, 2005).

Esse ensaio colorimétrico foi realizado tanto para associar seus resultados com os obtidos com o ensaio cometa quanto para, em uma possível indução de citotoxicidade, verificar a via de morte celular desencadeada. Nas células HSG (Figura 22), o extrato de *P. aquilinum* nas três diferentes concentrações mostrou citotoxicidade maior que a observada no grupo controle negativo, porém a análise estatística constatou que essa superioridade só foi estatisticamente significativa no tratamento com a concentração intermediária. As células OSCC-3 (Figura 23) demonstraram maior citotoxicidade aos mesmos tratamentos. Todos os tratamentos induziram uma taxa de degeneração estatisticamente superior à observada no grupo controle negativo, sendo que a concentração intermediária de extrato também foi a que induziu maior citotoxicidade e as outras duas induziram taxas equivalentes entre si. Quanto à via de degeneração apresentada por ambos os tipos celulares, em todos os tratamentos, predominou a apoptose.

O ensaio de alaranjado de acridina, embora seja relatado como bastante acurado (Renvoisé *et al.*, 1998), permitiu a identificação clara apenas das células em necrose. Em alguns casos, a distinção entre as células viáveis e apoptóticas era difícil. Visando ao esclarecimento de eventuais discrepâncias na análise desse experimento, realizou-se o ensaio de TUNEL. Tem-se relatado que esse último ensaio, além de se aplicar a vários tipos de material (células em cultura ou amostras de qualquer tecido, inclusive de sangue), tem sensibilidade suficiente para detectar uma pequena quantidade de células apoptóticas e pode identificá-las em estágios precoces desse processo (revisto por Otsuki *et al.*, 2003). A análise desse experimento também foi feita de duas maneiras: de forma visual e por meio da citometria de fluxo.

As duas formas de análise do ensaio de TUNEL mostraram resultados semelhantes entre si. Nas células HSG (Figuras 24 e 25), o tratamento com o extrato nas concentrações de

0,20 e 0,40 mg/mL induziu taxas de degeneração celular, por meio da apoptose, estatisticamente equivalentes entre si e que variaram de 12,66% a 19,96%. Essas taxas não se mostraram estatisticamente diferentes da observada, por meio da citometria de fluxo, no grupo controle negativo. Já a concentração de 0,67 mg/mL induziu a apoptose em uma frequência que se mostrou de 3,8 vezes (citometria de fluxo) e 6 vezes (análise visual) superior às frequências induzidas pelas duas outras concentrações. Nas células OSCC-3 (Figuras 26 e 27), as concentrações de extrato que se mostraram mais citotóxicas foram, de maneira estatisticamente equivalente, a de 0,20 e a de 0,67 mg/mL. A concentração de 0,40 mg/mL induziu apoptose em uma taxa superior à verificada no grupo controle negativo, porém inferior aos demais tratamentos. Considerando que o extrato, mesmo nas concentrações mais baixas, induziu as células OSCC-3 à degeneração celular por apoptose, diferentemente do observado com as células HSG, verificou-se que as células OSCC-3 seriam mais sensíveis aos efeitos citotóxicos.

A citotoxicidade induzida pelo extrato de *P. aquilinum* não se mostrou dependente da dose administrada nas diferentes abordagens experimentais. Como discutido por Orrenius (2004), toxinas como a tributilina (TBT) têm sido relatadas como indutoras da apoptose apenas até certas doses. No caso da toxicidade da TBT, o determinante para a indução de apoptose é o nível intracelular de ATP. Uma vez que a TBT atinge a mitocôndria e prejudica a produção de ATP, as células se tornam mais dependentes da produção de ATP pela via glicolítica. Se o nível de ATP é mantido, ocorre o intumescimento da mitocôndria seguido da liberação do citocromo c e da ativação de caspases. Se o nível de ATP estiver muito diminuído, a ativação de caspases é bloqueada. Assim, altas doses desse composto são capazes de inibir a atividade de caspases, o que pode estar relacionado com a habilidade de a toxina se ligar a grupos tiol essenciais e, conseqüentemente, bloquear a ativação da pró-caspase 8. De maneira semelhante, uma toxina pode ter efeito anti-apoptótico quando, em concentrações mais elevadas, chegar a induzir uma mudança no potencial de oxi-redução celular. Esse é o caso do ditiocarbamato de pirrolidina e do arsênico, que, em altas doses, interferem negativamente na ativação das caspases. Outros estudos têm relatado que certos compostos tóxicos só induzem efeitos genotóxicos e/ou citotóxicos a partir de uma dose-limiar. Conforme Kirkland e Müller (2000), certas genotoxinas, em doses subcríticas, não induziriam respostas específicas, o que ocorreria apenas a partir de uma dose-limiar. A maioria dos tratamentos tóxicos, porém, apresenta comportamento diferente, e seus efeitos são linearmente proporcionais à dose, não exibindo um limiar. Esse é o caso da radiação ionizante. Os dados discutidos acima subsidiam a não-correlação dose versus efeito verificada em nos experimentos do presente estudo. Nesse sentido, outras abordagens experimentais

poderiam esclarecer as diferenças encontradas. Ainda em relação à dosagem versus citotoxicidade, o extrato da samambaia mostrou um efeito diferente da radiação ionizante, apesar de ser considerada radiomimética.

A divergência entre as taxas de apoptose verificadas nos ensaios de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo e de TUNEL provavelmente se devem à diferença de sensibilidade entre as técnicas. Comparando os resultados desse último experimento com os obtidos no ensaio cometa (análise visual), pode-se inferir, para as células HSG, que as taxas de citotoxicidade induzidas em cada um dos grupos tratados com extrato foram inferiores às taxas de genotoxicidade verificadas para os mesmos grupos experimentais. Para as células OSCC-3, entretanto, não se pode estabelecer uma relação entre os resultados do ensaio cometa e os testes de detecção de apoptose. No ensaio de TUNEL, verificaram-se taxas de morte celular por apoptose que foram, em todos os grupos tratados, muito maiores que as freqüências de células com dano no DNA (ensaio cometa). Embora a fragmentação do DNA seja uma marca característica da apoptose, ativada por qualquer que seja o mecanismo, esse evento pode ou não ser evidenciado pelo ensaio cometa. O ensaio de TUNEL, detecta apoptose desde sua fase inicial, quando se dão as primeiras clivagens internucleossomais. Já o ensaio cometa detecta quebras apenas quando já se tornam visíveis em um rastro. Assim, é possível que muitas das células apoptóticas identificadas no ensaio de TUNEL estivessem em uma fase da apoptose anterior à fragmentação do DNA. Entretanto devemos considerar que, apesar de ambos experimentos apresentarem os resultados na forma de freqüências, nas quais baseamos as comparações, trata-se de abordagens experimentais de princípios bem distintos (estrutura do DNA x imunocitoquímica), o que poderia dificultar a comparação dos dados.

Genotoxicidade e citotoxicidade podem estar fortemente relacionadas. O dano no DNA é considerado um importante mecanismo indutor de apoptose (Delfino *et al.*, 2000). Conforme revisto por Rich *et al.* (2000), a estratégia das células eucarióticas para lidar com o dano ao DNA inclui o reconhecimento do DNA lesado, a avaliação do dano nos pontos de checagem e a implementação de uma resposta apropriada: reparo do DNA ou morte celular. Esses procedimentos não são ativados de maneira simples e linear, mas, quando o dano ao DNA é excessivo ou quanto atinge regiões específicas do genoma, superando a capacidade de reparo da célula, inicia-se um processo de degeneração, preferencialmente, a apoptose.

Além do dano ao DNA, outras alterações celulares podem ser as responsáveis pela indução da apoptose, como a inibição da síntese protéica (Lennon *et al.*, 1991), estresse oxidativo (Dypbukt *et al.*, 1994), privação de algum nutriente (revisto por Evan & Littlewood, 1998), liberação de glutamato (Ankarcrona *et al.*, 1995) ou do óxido nítrico (Bonfoco *et al.*, 1995), além de danos irreversíveis a estruturas celulares, como o retículo

endoplasmático (Morishima *et al.*, 2004), a mitocôndria, e o citoesqueleto (revisto por Leist & Nicotera, 1997). Considerando que não foi possível relacionar diretamente os resultados obtidos no ensaio cometa com as taxas de apoptose induzidas pelo tratamento com o extrato de *P. aquilinum*, provavelmente outras vias de indução de apoptose estão sendo ativadas. Dessa forma, pode-se inferir que a ptaquilosida, relatada como o princípio tóxico da planta e responsável pela ligação covalente ao DNA, pode também atuar danificando a célula por outros mecanismos ou mesmo. Não se pode ainda excluir a hipótese de que existam outros princípios tóxicos na planta.

A apoptose não significa apenas uma via de morte celular. A regulação desse processo, bem como as alterações a ele relacionadas, desempenham ainda importante papel na remoção de células, na proliferação, na diferenciação e na tumorigênese. Uma associação causal entre as alterações genéticas e o câncer tem sido largamente demonstrada por dados experimentais e epidemiológicos. A inativação mutacional de genes supressores de tumor e a ativação de oncogenes estão associadas com o desenvolvimento de diversos tipos de cânceres. Essa ligação é particularmente evidente em cânceres induzidos pela exposição a substâncias tóxicas que, em alguns casos, levam a um padrão característico de mutações. Carcinógenos conhecidos como diretamente genotóxicos costumam formar ligações covalentes com o DNA, o que pode causar mutações durante a replicação do DNA. A samambaia *P. aquilinum* possui compostos que se situam entre tais carcinógenos. Diferentes formas como compostos presentes em extratos da planta, isolados ou não, se ligam covalentemente ao DNA, criando os chamados *DNA adducts*, têm sido descritas (Freitas *et al.*, 2001). Essa forma de dano é também conhecida como alquilação.

A ligação entre a mutagênese e a carcinogênese é também associada a defeitos no reparo do DNA que levam a um aumento no risco de desenvolvimento de câncer. Normalmente, os mecanismos de reparo do DNA servem para suprimir a mutagênese corrigindo o dano ao DNA antes que ele possa gerar mutações que serão herdadas por células-filhas. Tem sido também postulado que a mutagênese desempenha importante papel tanto na fase de iniciação quanto na de progressão da carcinogênese, e que um passo essencial é o desenvolvimento de um estado de instabilidade no qual os processos normais que suprimem a mutagênese são comprometidos (revisto por Dixon. & Kopras, 2004).

Face ao exposto acima, para que possamos associar os efeitos genotóxicos e citotóxicos, verificados em nosso estudo, com o processo de carcinogênese, necessitamos de análise de expressão gênica e da adoção de um modelo *in vivo*. Por exemplo, animais experimentais poderiam ser tratados com as diferentes concentrações de extrato aquoso de *P.*

aquilinum para avaliação da morfologia e da integridade do material genético das células das grandes glândulas salivares e da mucosa bucal.

6. *Conclusões*

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, é lícito concluir que:

1. O extrato aquoso não fracionado de *P. aquilinum* nas diferentes concentrações estudadas (0,20 e 0,40 e 0,67 mg/mL) foi genotóxico para as linhagens celulares HSG e OSCC-3;
2. A genotoxicidade induzida pelo extrato não foi dependente da dose administrada a ambos os tipos celulares;
3. O extrato de *P. aquilinum* mostrou-se citotóxico para as células HSG e OSCC-3 nas concentrações (0,20 e 0,40 e 0,67 mg/mL), porém essa toxicidade não foi proporcional à concentração de extrato utilizada nos tratamentos;
4. A partir das análises morfológicas, ultraestrutural e molecular (TUNEL), demonstrou -se que a principal via de degeneração celular induzida pelo extrato nas linhagens HSG e OSCC-3 foi a apoptose.

7. Perspectivas

Para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na genotoxicidade e citotoxicidade do extrato aquoso da samambaia *P. aquilinum*, propõem-se:

1. Analisar a expressão de genes envolvidos no ciclo celular (e.g. *p53* e *c-myc*) e na apoptose (e.g. *bax* e *bcl-2*) em células HSG e OSCC-3 tratadas com extrato aquoso de *P. aquilinum*;
2. Analisar, por meio de marcadores moleculares, a heterogeneidade alélica das células ao longo dos tratamentos;
3. Estabelecimento de um modelo experimental *in vivo*.

8. Referências Bibliográficas

- AFRAMIAN, D. J.; CUKIERMAN, E.; NIKOLOVSKI, M. S.; MOONEY D. J.; YAMADA, K. M. and BAUM, D. M. D. The growth and morphological behavior of salivary epithelial cells on matrix protein-coated biodegradable substrata. **Tissue Engineering**, 6(3) : 209-216, 2000.
- AIKO, K.; TSUJISAWA, T.; KOSEKI, T.; HASHIMOTO, S.; MORIMOTO, Y.; AMAGASA, T., NISHIHARA, T. Involvement of cytochrome c and caspases in apoptotic cell death of human submandibular gland ductal cells induced by concanamycin A. **Cellular Signalling**, 14 : 717– 722, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, M. F. M. **Avaliação do Potencial Genotóxico da Samambaia *Pteridium aquilinum***. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 1999.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDAÑO, M. Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. **Curret Medicinal Chemistry**, 9(6) : 675-686, 2002.
- ALONSO-AMELOT, M. E & AVENDAÑO, M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. **International Journal of Cancer**, 91(2) : 252-259, 2001.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; CASTILLO, U.; SMITH, B. L. Bracken ptaquiloside in milk. **Nature**, 382 : 6592, 587, 1996.
- AMES, B. N. & GOLD, L. S. Dietary carcinogens, environmental pollution, and cancer: some misconceptions. **Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy**, 7(2-3) : 69-85, 1990.
- ANGERMÜLLER, S.; KÜNSTLE, G.; TIEGS, G. Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF_α-treated galactosamine-sensitized mice. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 46 : 1175–1183, 1998.
- ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J. M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S. A.; NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, 15 : 961–973, 1995.
- ATSUMI, T.; IWAKURA, I.; FUJISAWA and UEHA, T. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. **Biomaterials**, 22 : 1459-1466, 2001a.
- ATSUMI, T.; IWAKURA, I.; FUJISAWA and UEHA, T. The production of reactive oxygen species by irradiated camphorquinone-related photosensitizers and their effect on cytotoxicity. **Archives of Oral Biology**, 46 : 391-401, 2001b.
- BALASUBRAMANIAN, S.; & GOVINDASAMY, S. Inhibitory effect of dietary flavonol quercetin on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Carcinogenesis** 17(4) : 877-879, 1996.
- BENDOTTI, C.; CALVARESI, N.; CHIVERI, L.; PRELLE, A.; MOGGIO, M.; BRAGA, M.; SILANI, V.; DE BIASI, S. Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome

- oxidase histochemical reactivity. **Journal of the Neurological Sciences**, 191 : 25–33, 2001.
- BENISTON, R. G.; & SAVERIA CAMPO, M. Quercetin elevates p27Kip1 and arrests both primary and HPV16 E6/E7 transformed human keratinocytes in G1. **Oncogene**, 22 : 5504-5514, 2003.
- BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C. M.; GAREWAL, H. DNA repair/pro-apoptotic dual role proteins in five major DNA repair pathways: fail safe protection against carcinogenesis. **Mutation Research**, 511 : 145-178, 2002.
- BRINK, A.; SCHULZ, B.; KOBRAS, K.; LUTZ, W. K.; STOPPER H. Time-dependent effects of sodium arsenite on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay. **Mutation Research**, 603 : 121–128, 2006.
- BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 92: 72162–72166, 1995.
- BOTA, D. A.; NGO, J. K.; DAVIES, K. J. A. Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, 38 : 665– 677, 2005.
- CAMPO, M. S.; McCAFFERY, R. E.; DOHERTY, I.; KENNEDY, I. M.; JARRETT, H. M. Association of bovine papilloma virus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**, 52 : 6898-6904, 1990.
- CAMPO, M. S.; MOAR, M. H.; JARRETT, H. M.; LAIRD, A. A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. **Nature**, 286 : 180-182, 1980.
- CAMPOS DA PAZ, M. **Citotoxicidade induzida pelo extrato de *Pteridium aquilinum* sobre células HSG e OSCC**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia. Universidade de Brasília, Brasília, 2005.
- CARRANZA-ROSALES, P.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; SEPÚLVEDA-SAAVEDRA, J.; CRUZ-VEGA, D. E.; JAY GANDOLFI, A. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. **Toxicology**, 210 : 111–121, 2005.
- CESCHINI, L. **Análises do extrato aquoso de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger: propriedade antioxidante e citotoxicidade em Células de Ovário de Hamster Chinês**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia. Universidade de Brasília, Brasília, 2003.
- CHOUCROUN, P.; GILLET , D.; DORANGE, G.; SAWICKI, B.; DEWITTE, J. D. Comet assay and early apoptosis. **Mutation Research**, 478 : 89–96, 2001.
- CONNOLLY, J. A.; MORGAN, I. M.; JACKSON, M. E.; CAMPO, M. S. The BPV-4 co-carcinogen quercetin induces cell cycle arrest and upregulates the LCR of BPV-4. **Oncogene**, 15 : 2739-2746, 1998.

- DANIELS, P. J.; GUSTAFSON, S. A., FRENCH, D., WANG, Y.; DePOND, W.; McARTHUR, C. P. Interferon-mediated block in cell cycle and altered integrin expression in a differentiated salivary gland cell line (HSG) cultured on matrigel. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, 20 : 1101-1109, 2000.
- DAWRA, R. K.; SHARMA, O. P.; VAID, J.; KRISHNA, L. Erythrocyte membrane alterations in enzootic bovine hematuria. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**. 61(3) : 421-424, 1988.
- DELFINO, A. B. M.; BARRETO, E. C.; SILVA, E. T.; MENDONÇA, R. G.; ORNELLAS, M. H. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose – carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 43(3) : 173-186, 1997.
- DIXON, K. & KOPRAS, E. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, 14 : 441–448, 2004.
- DÖBEREINER, J.; TOKARANIA, C. H. & CANELLA, C. F. C. Ocorrência da hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2: 489-504, 1967.
- DYPBUKT, J. M.; ANKARCORONA, M.; BURKITT, M.; SJÖHOLM, A.; STRÖM, K., ORRENIUS, S.; NICOTERA, P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. **The Journal of Biological Chemistry**, 269 : 30533–30560, 1994.
- EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, 40 : 193–236, 2002.
- EVAN, G.; & LITTLEWOOD, T. A Matter of Life and Cell Death. **Science**, 281(28) : 1317-1322, 1998.
- EVANS, I. A The radiomimetic nature of bracken toxin. **Cancer Research**, 28 : 2252-2258, 1968.
- EVANS, I. A. & MASON, J. Carcinogenic activity of bracken. **Nature**, 208 : 913-914, 1965.
- FAZAL, F.; RAHMAN, R.; GREESIL, J.; AINLEY, K.; HADI, S. M.; PARISH, J. H. Strands scission in DNA by quercetin and Cu(II): identification of free radicals intermediates and biological consequences of scission. **Carcinogenesis**, 11 : 2005-2008, 1990.
- FRANÇA, T. N.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P.V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira** 22(3) : 85-96, 2002.
- FREITAS, R. N.; O'CONNOR, P. J. ; PRAKASH, A. S.; SHAHIN, M.; POVEY, A. C. Bracken (*Pteridium aquilinum*) – induced DNA adducts in mouse tissues are different from the adduct induced by the activated form of the Bracken carcinogen ptaquiloside. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 281 (2): 589-594, 2001.
- GALLMEIER, E.; WINTER, J. M.; CUNNINGHAM, S. C.; KAHN, S. R.; SCOTT, E. K. Novel Genotoxicity Assays Identify Norethindrone to Activate p53 and Phosphorylate H2AX. **Carcinogenesis**, 26(10) : 1811-1820, 2005.

- GALPIN, O. P.; WHITAKER, C. J.; KASSAB, J. Y. Gastric cancer in Gwynedd. Possible links with Bracken. **British Journal of Cancer**, 61 : 737-740, 1990.
- GAVA, A.; NEVES, D. S.; GAVA, D.; SALIBA, T. M.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning in cattle in Southern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, 44(6) : 362-365, 2002.
- GERENUTTI, M.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Sobre os efeitos nocivos do *Pteridium aquilinum* (samambaia) em diferentes espécies animais. **Biotemas**, 5(2) : 41-50, 1992a.
- GERENUTTI, M.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum* L Kuhn) feeding during the development of female rats and their offspring. **Veterinary and Human Toxicology**, 34(4) : 307-310, 1992.
- GHOBRIAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, 55 : 178-194, 2005.
- GONZALEZ DE MEJIA, E.; SONG, Y. S.; RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(6) : 1966-73, 2005.
- GREY, C. E. & ADLERCREUTZ, P. Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutation Research**, 527 : 27-36, 2003.
- HARTMANN, A. & SPEIT G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, 90 : 183-188, 1997.
- HASHITANI, S.; URADE, M.; NISHIMURA, N.; MAEDA, T.; TAKAOKA, K.; NOGUCHI, K.; SAKURAI, K. Apoptosis induction and enhancement of cytotoxicity of anticancer drugs by celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human head and neck carcinoma cell lines. **International Journal of Oncology**, 23 : 665-672, 2003.
- HASINA, R.; HULLET, K.; BICCIATO, S.; DI BELLO, C.; PETRUZZELLI, G. J.; LINGEN, M. W. Plasminogen activator inhibitor-2: a molecular biomarker for head and neck cancer progression. **Cancer Research**, 63(3) : 555-9, 2003.
- HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, 66 : 1527-1535, 2003.
- HIRAYAMA, T. Diet and cancer. **Nutrition and Cancer**, 1 : 67-81, 1979.
- HIRONO, I. Carcinogenic principles isolated from bracken fern. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, 17(1) : 1-22, 1985.
- HIRONO, I.; YAMADA, K.; NIWA, H.; SHIZURI, Y.; OJIKI, M.; HOSAKA, S.; YAMAJI, T.; WAKAMATSU, K.; KIGOSHI, H.; NIYAMA, K.; UOSAKI, Y. Separation of carcinogenic fraction of bracken fern. **Cancer Letters**, 21: 239-246, 1984a.
- HIRONO, I.; AISO, S.; YAMAJI, T.; MORI, H.; YAMADA, K.; NIWA, H.; SHIZURI, Y.; OJIKI, M.; WAKAMATSU, K.; KIGOSHI, H.; NIYAMA, K.; UOSAKI, Y. Carcinogenicity in rats of ptaquiloside isolated from bracken. **Gann**, 75 : 833-836, 1984b.

- HIRONO, I.; UENO, I.; HOSAKA, S.; TAKANASHI, H.; MATSUSHIMA, T.; SUGIMURA, T.; NATORI, S. Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. **Cancer Letters**, 13 : 15–21, 1981.
- HIRONO, I.; SHIBUYA, C.; FUSHIMI, K.; HAGA, M. Studies on carcinogenic properties of braken, *Pteridium aquilinum*. **Journal of the National Cancer Institute**, 45 : 179-188, 1970.
- HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; SAKATA, T.; INUI, M.; ITO, N. Effect of quercetin on two-stage carcinogenesis of the rat urinary bladder. **Cancer Letters**, 21 : 23–27, 1983.
- HOROZ ,M.; BOLUKBAS , C.; BOLUKBAS , F. F.; KOCYIGIT , A.; ASLAN , M.; KOYLU , A.O.; GUMUS, M.; CELIK , H.; KOKSAL, M. Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection. **Mutation Research** , 596 : 137-142, 2006.
- ITO, N.; HAGIWARA, A.; TAMANO, S.; KAGAWA, M.; SHIBATA, M.A.; KURATA, Y.; FUKUSHIMA, S. Lack of carcinogenicity of quercetin in F334/DuCrj rats, **Japanese Journal of Cancer Research**, 80 : 317–325, 1989.
- JALONSYNSKI, P.; KUJAWSKY, M.; CZUB-SWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J.; and SZYFTER, K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. **Mutation Research**, 385 : 223-233, 1997.
- JANZ, S.; SHACTER, E. A new method for delivering alkanes to mammalian cells: preparation and preliminary characterization of an inclusion complex between beta-cyclodextrin and pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane). **Toxicology**, 69(3) : 301-315, 1991.
- JARRET, W.F. Environmental carcinogens and papilloma viruses in the pathogenesis of câncer. **Proceedings of the Royal Society of London**, 231 : 1-11, 1987.
- JARRETT, W. F.; McNEIL, P. E., GRIMSHAW, W. T.; SELMAN, I. E.; McINTYRE, W. I. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma virus. **Nature**, 274(5668) : 215-217, 1978.
- JASPERSEN-SCHIB, R. THEUS, L. GUIRGUIS-OESCHGER, M.; GOSSWEILER, B.; MEIER-ABT, P. J. Wichtige Pflanzenvergiftungen in der Schweiz. **Schweizerische Medizinische Wochenschrift**, 126 : 1085–1098, 1996. *apud* KAWOHL, W. & HABERMEYER, E. Plant poisonings – a problem extending the scope of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, 100 :138–139, 2005.
- KAMACHI, M.; KAWAKAMI, A.; YAMASAKI, S.; HIDA, A.; NAKASHIMA, T.; NAKAMURA, H.; IDA, H.; FURUYAMA, M.; NAKASHIMA, K.; SHIBATOMI, K.; MIYASHITA, T.; MIGITA, K.; EGUCHI, K. Regulation of apoptotic cell death by cytokines in a human salivary gland cell line: Distinct and synergistic mechanisms in apoptosis induced by tumor necrosis factor α and interferon γ . **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 139(1) : 13-19, 2002.
- KANEKO, T.; CHIBA, H.; YASUDA, T.; KUSAMA, K. Detection of photodynamic therapy-induced earlyapoptosis in human salivary gland tumor cells in vitro and in a mouse tumor model. **Oral Oncology**, 40 : 787–792, 2004.

- KAUFMANN, S. H. & HENGARTNER, M. O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. **Trends in Cell Biology**, 11(12) : 526-534, 2001.
- KAWASE, M.; SAKAGAMI, H.; KUSAMA, K.; MOTOHASHI, N.; SAITO, S. α -Trifluoromethylated acylolins induce apoptosis in human oral tumor cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 9 : 3113-3118, 1999.
- KIRKLAND, D. J.; MÜLLER, L. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. **Mutation Research**, 464: 137-147, 2000.
- KONCA, K.; LANKOFF, A.; BANASIK, A.; LISOWSKA, H.; KUSZEWSKI, T.; GÓZDZ, S.; KOZA, Z.; WOJCK, A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. **Mutation Research**, 534 : 15-20, 2003.
- KOSMIDER, B.; ZYNER, E.; OSIECKA, R. and OCHOCKI, J. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis- Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis DDP. **Mutation Research**, 563 : 61-70, 2004.
- KUMAR, P.; BENEDICT, R.; URZUA, F.; FISCHBACH, C.; MOONEY, D.; POLVERINI, P. Combination treatment significantly enhances the efficacy of antitumor therapy by preferentially targeting angiogenesis. **Laboratory Investigation**, 85(6) : 756-67, 2005.
- LEE, G.; KIM, Y. B.; KIM, J. H.; KIM, M. S.; SHIN, K. H.; WON, Y. S.; LEE, J. I.; CHOUNG, P. H.; HYUN, B. H. and MIN, B. M. Characterization of novel cell lines established from three human oral squamous cell carcinomas. **International Journal of Oncology**, 20(6) : 1151-1159, 2002.
- LEE, M.; KWON, J.; CHUNG, M. Enhanced prediction of potent rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. **Mutation Research**, 541 : 9-19, 2003
- LEIST, M. & NICOTERA, P. The Shape of Cell Death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 236 : 1-9, 1997.
- LENNON, S. V.; MARTIN, S. J.; COTTER, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Proliferation**, 24 : 203-214, 1991.
- LI, L.; TIAN, Y.; TAD, M. O.; FENG, Y.; QU, S. S. Apoptosis of tumour cells by temperature and anti-tumour drug: microscopic and macroscopic investigations. **Journal of Thermal Biology**, 28 : 321-329, 2003.
- LIOI, M. B.; BARBIERI, R.; BORZACCHIELO, G.; DEZZY, S.; ROPERTO, S.; RUSSO, V.; ROPERTO, F. Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, 131 : 233-236, 2004.
- LUND, P. K.; NAMORK, E.; BRORSON, S. H.; WESTVIK, A.; JO, G.B.; ØVSTEBØ, R.; KIERULF, P. The fate of monocytes during 24 h of culture as revealed by flow cytometry and electron microscopy. **Journal of Immunological Methods**, 270 : 63- 76, 2002.
- MATOBA, M. SAITO, K.; KOYAMA, K.; NATORI, S.; MATSUSHIMA, T.; TAKIMOTO, M. Assay of ptaquiloside, the carcinogenic principle of bracken *Pteridium aquilinum*, by mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium*. **Mutagenesis**, 2(6) : 419-423, 1987.

- MICHOR, F.; IWASA, Y.; VOGELSTEIN, B.; LENGAUER, C.; NOWAK, M. A. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? **Seminars in Cancer Biology**, 15 : 43-49, 2005.
- MORINO, K.; MATSUKURA, N.; KAWACHI, T.; OHGAKI, H.; SUGIMURA, T.; HIRONO, I. Carcinogenicity test of quercetin and rutin in golden hamsters by oral administration. **Carcinogenesis**, 3 : 93-97, 1982.
- MORISHIMA, N.; NAKANISHI, K.; TSUCHIYA, K.; SHIBATA, T.; SEIWA, E. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, 279(48) : 50375-50281, 2004.
- MOURA, J. W.; STOCCO DOS SANTOS, R. C.; DAGLI, M. L.; D'ÁNGELINO, J. L.; BIRGEL, E. H.; BECAK, W. Chromosomal aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. **Experientia**, 44 : 785-789, 1988.
- NAGAO, T.; SAITO, K.; HIRAYAMA, E.; UCHIKOSHI, K. ; KOYAMA, K.; NATORI, S.; MORISAKI, N.; IWASAKI, S.; MATSUSHIMA, T. Mutagenicity of ptaquiloside, the carcinogen in bracken, and its related illudane-type sesquiterpene. **Mutation Research**, 215 : 173-178, 1989.
- NAGATA, S. DNA Degradation in development and programmed cell death. **Annual Review of Immunology**, 23 : 853-875, 2005.
- NICOTERA, P.; LEIST, M. Energy supply and the shape of death in neurons and lymphoid cells. **Cell Death and Differentiation**, 4(6) : 435-42, 1997.
- NIWA, H.; OJIKI, M.; WAKAMATSU, K.; YAMADA, K. HIRONO, I.; MATSUSHITA, K. Ptaquiloside, a novel sesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. **Tetrahedron Letters**, 24(38) : 1227-4120, 1983.
- NOR, J. E.; CHRISTENSEN, J.; LIU, J.; PETERS, M.; MOONEY, D. J.; STRIETER, R. M.; POLVERINI, P. J. Up-Regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. **Cancer Research**, 61(5) : 2183-8, 2001.
- OHLSSON, M.; JONSSON, R.; BROKSTAD, K. A. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 e La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjögrens Syndrome. **Scandinavian Journal of Immunology**, 56 : 456-469, 2002.
- OLIVE, P. L., BANÁTH, J. P., DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet Assay". **Radiation Research**, 122 : 86-94, 1990.
- OLIVEIRA-PEREIRA, L., MELLO-DE-SOUZA, T. M., ALMEIDA-SANTOS, M. F. M.; POÇAS-FONSECA, M. J. **Growth rate and morphological effects of the *Pteridium aquilinum* aqueous extract on HSG cells *in vitro***. Anais da XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002.
- ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicology Letters**, 149 : 19-23, 2004.

- OTSUKI, Y.; LI, Z.; SHIBATA, M. Apoptotic detection methods- from morphology to gene. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, 38(3) : 275-340, 2003.
- PAMAKCU, A. M.; & PRICE, J. M. Induction of intestinal and urinary bladder cancer in rats by feeding bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Journal of the National Cancer Institute**, 43 : 275-281, 1969.
- PAMUKCU, A. M.; YALCINER, S.; HATCHER, J.; BRYAN, G. T. Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Research**, 40 : 3468-3472, 1980.
- PENNIE, W. D; SAVERIA CAMPO, M. Synergism between Bovine Papillomavirus Type 4 and the Flavonoid Quercetin in cell transformation *in vitro*. **Virology**, 190 : 861-865, 1992.
- POTTER, D. M. & BAIRD, M. S. Carcinogenic effects of ptaquiloside in bracken fern and related compounds. **British Journal of Cancer**, 83(7) : 914-920, 2000.
- PRAKASH, A. S.; PEREIRA, T. N.; SMITH, B. L.; SHAW, G.; SEAWRIGHT, A. A. Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. **Natural Toxins**, 4 : 221-227, 1996.
- RASMUSSEN, L. H. **Ptaquiloside – an environmental hazard?** Occurrence and fate of a Bracken (*Pteridium* sp.) toxin in terrestrial environment. Thesis (Ph.D programme for Natural Sciences) – Chemistry Department. The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark, 2003.
- RASMUSSEN, L. H.; JENSEN, L. S.; HANSEN, H. C. Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. **Journal of Chemical Ecology**, 29(3) : 771-778, 2003a.
- RASMUSSEN, L. H.; KROGHSBO, S.; FRISVAD, J. C.; HANSEN, H. C. Occurrence of the carcinogenic Bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. **Chemosphere**, 51(2) : 117-127, 2003b.
- RENVOISÉ , C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BRÉARD, J. Apoptosis: Identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**. 14 : 111-120, 1998.
- RIBEIRO, L. R.; RIOS, A. C.; SILVA, A. R.; OLIVEIRA, S.V.; OLIVEIRA, M.D.M.; BATISTA, A. R. P. L.; SALES, L. A. E SALVADORI, D.M.F. *Pteridium aquilinum*: um estudo toxicogenético. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 8 (2) : 1-4, 1995.
- RICH, T.; ALLEN, R. L.; WYLLIE, A. H. Deying death after DNA damage. **Nature**, 407 : 777-783, 2000.
- RIET-CORREA, F. & MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 21(1) : 38-42, 2001.
- RIETJENS, I. M. C. M.; BOERSMA, M. G.; van der WOUDE, H.; JEURISSEN, S. M. F.; SCHUTTE, M. E.; ALINK, G. M. Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mutation Research**, 574 : 124–138, 2005.

- ROSEMBERGER, G. & HEESCHEN, W. Adlerfarm (*Pteris aquilina*) – die Ursache des sog. Stallrotzes der Rinder (Haematuria vesicalis bovis chronica). Dtsch. Tierärztl Wschr. 65 : 201-208, 1960 *apud* GERENUTTI, M.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Sobre os efeitos nocivos do *Pteridium aquilinum* (samambaia) em diferentes espécies animais. **Biotemas**, 5(2) : 41-50, 1992.
- ROSER, S.; POOL-ZOBEL, B.-L.; RECHKEMMERA, G. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. **Mutation Research**, 497 : 169–175, 2001.
- SANTOS, R.C.; BRASILEIRO FILHO, G. & HOJO, E. S. Induction of tumors in rats by bracken fern (*Pteridium aquilinum*) from Ouro Preto, (Minas Gerais, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 20 (1) : 73-77, 1987.
- SANTOS, R.C. Considerações sobre o uso do broto da samambaia na alimentação. **Ciência e Cultura**, 42 : 216-219, 1990.
- SARTOR, M.; STEINGRIMSDOTTIR, H.; ELAMIN, F.; GAKEN, J.; WARNAKULASURIYA, S.; PARTRIDGE, M.; THAKKER, N.; JOHNSON, N. W.; TAVASSOLI, M. Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. **British Journal of Cancer**, 80(1-2) : 79-86, 1999.
- SATYANARAYANA, P.; SINGH, D.; CHOPRA, K. Quercetin, a bioflavonoid, protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cyclosporine in rats. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, 23 : 175–181, 2001.
- SHAHIN, M.; MOORE, M. R.; WORRALL, S.; SMITH, B. L.; SEAWRIGHT, A. A.; PRAKASH, A. S. H-ras activation is an early event in the ptaquiloside-induced carcinogenesis: comparison of acute and chronic toxicity in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 250 : 491-497, 1998.
- SHAHIN, M.; SMITH, B. L.; PRAKASH, A. S. Bracken carcinogens in human diet. **Mutation Research**, 443 : 69-79, 1999.
- SHIRASUNA, K.; SATO, M.; MIYAZAKY, T. A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. **Cancer**, 48 : 745, 1981.
- SIEBER, O.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I. Genomic stability and tumorigenesis. **Seminars in Cancer Biology**, 15 : 61-66, 2005.
- SILVEIRA, E. B.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N. Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, 35(2) : 129-139, 2003.
- SIMÁN, S. E.; POVEY, A. C.; WARD, T. H.; MARGISON, G. P.; SHEFFELD, E. Fern spore extracts can damage DNA. **British Journal of Cancer**, 83(1) : 69-73, 2000.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 175 : 184-191, 1988.
- STOEWSAND, G. S.; ANDERSON, J. L.; BOYD, J. N.; HRAZDINA, G.; BABISH, J. G.; WALSH, K. M.; LOSCO, P. Quercetin: a mutagen, not a carcinogen in Fisher rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 14 : 105–114, 1984.

- SU, S.; HAIL JR, N.; LOTAN, R. Apoptosis as a Novel Target for Cancer Chemoprevention. **Journal of the National Cancer Institute**, 96(9) : 662-672 , 2004.
- SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis**, 21(3) : 387-395, 2000.
- SUMI, Y.; HIRONO, I; HOSAKA, S.; UENO, I.; MIYAKAWA, M. Tumor induction in germ-free rats fed braken (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Research**, 41 : 250-252, 1981.
- SUZUKI, S.; TAKADA, T.; SUGAWARA, Y.; MUTO, T.; KOMINAMI, R. Quercetin induces combinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. **Japanese Journal of Cancer Research**, 82 : 1061-1064, 1991.
- TAKAHASHI, A.; MATSUMOTO, H.; YUKI, K.; YASUMOTO, J.; KAJIWARA, A.; AOKI, M.; FURUSAWA, Y.; OHNISHI, K. and OHNISHI, T. High-let radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of P53 status. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, 60(2) : 591–597, 2004.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 35(3) : 206-221, 2000.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plants poisoning affects livestock in Brazil. **Toxicol**, 40 : 1635-1660, 2002.
- TRINCAVELLI, M. L.; FALLEN, A.; CHELLI, B.; TUSCANO, D.; COSTA, B.; GREMIGNI, V.; LUCACCHINI, A.; MARTINI, C. A_{2A} adenosine receptor ligands and proinflammatory cytokines induce PC 12 cell death through apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, 66 : 1953–1962, 2003.
- VANDER-HEIDEN, M. G.; CHANDEL, N. S.; WILLIANSO, E. K.; SCHUMACKER, P. T.; THOMPSON, C. B. Bcl-XL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. **Cell**, 91 : 627-637, 1997.
- VILALOBOS-SALAZAR, J.; MENEZES, A.; ROJAS, L.; PORRAS, R.E. & HERRERO, M.V. Bracken derived carcinogens as affecting animal health and human in Costa Rica. In: **Bracken toxicity and carcinogenicity as related to animal and human health**. Ed. J. Taylor, Institute of Earth, Bangor, U.K., 1989.
- WALTER-MOURA, J. STOCCO, R.C.; DAGLI, M.L.Z.; D'ANGELINO, J.L; BIRGEL, E. H.; AND BEÇAK, W. Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. **Experientia**, 44 : 785- 789, 1988.
- WANG, S.; CUKIERMAN, E.; SWAIM, W. D., YAMADA, K. M., BAUM, B. J. Extracellular matrix protein-induced changes in human salivary epithelial cell organization and proliferation on a model biological substratum. **Biomaterials**, 20 : 1043-1049, 1999.
- WANG, Y. & HUANG, Z. Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro. **Pharmacological Research**, 52(2): 174-182, 2005.
- WARGOVICH, M.; ENG, V.; NEWMARK, H. Inhibition by plant phenols of benzo[a]pyrene-induced nuclear aberrations in mammalian intestinal cells: a rapid in vivo assessment method. **Food and Chemical Toxicology**, 23 : 47–49, 1985.

- WESWIG, P. H.; FREED, A. M.; HAAG, J. R. Antithiamine activity of plant materials. **The Journal of Biological Chemistry**, 165 : 737-738, 1946 *apud* FRANÇA, T. N.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P.V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polipodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 22(3) : 85-96, 2002.
- WILLINGHAM, M. C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 47(9) : 1101-1109, 1999.
- WYLLIE, A. H. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview, **Cancer Metastasis Reviews**, 11 : 95-103, 1992.
- WYLLIE, A. H. Glucocorticoidinduced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, 284 : 555–556, 1980.
- YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A. J. Comparison of Comet Assay, Electron Microscopy, and Flow Cytometry for Detection of Apoptosis. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 51(7) : 873–885, 2003.
- ZONG, W.; DITSWORTH, D.; BAUER, D. E.; WANG, Z.; and THOMPSON, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes & Development**, 18 : 1272–1282, 2004.
- ZUPANSKA, A.; DZIEMBOWSKA, M.; ELLERT-MIKLASZEWSKA, A.; GAWEDA-WALERYCH, K.; KAMINSKA, B. Cyclosporine a induces growth arrest or programmed cell death of human glioma cells. **Neurochemistry International**, 47 : 430–441, 2005.