

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA - PPGBTX**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE
IN VITRO DA CAPACIDADE GENOMODIFICADORA
DE COMPOSTOS QUÍMICOS E SINTÉTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Francine Carla Cadoná

Santa Maria, RS, Brasil

2013

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE *IN VITRO* DA CAPACIDADE GENOMODIFICADORA DE COMPOSTOS QUÍMICOS E SINTÉTICOS

Francine Carla Cadoná

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTIX), Área de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof^a Dra Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Carla Cadoná, Francine

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE IN VITRO DA CAPACIDADE GENOMODIFICADORA DE COMPOSTOS QUÍMICOS E SINTÉTICOS / Francine Carla Cadoná.-2013.

74 p.; 30cm

Orientador: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2013

1. Genotoxicidade 2. Genoproteção 3. Teste Gemo 4. dsDNA 5. PicoGreen® I. Beatrice Mânica da Cruz, Ivana II. Título.

**Universidade federal de santa maria
Centro de ciências naturais e exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE *IN VITRO* DA
CAPACIDADE GENOMODIFICADORA DE COMPOSTOS QUÍMICOS
E SINTÉTICOS**

elaborada por
Francine Carla Cadoná

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra. (UFSM)
(Orientadora)

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)

Cristina da Costa Krewer, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 16 de julho de 2013.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por estar sempre guiando os meus passos.

A minha orientadora Prof^a Dra Ivana pela oportunidade e pela confiança. Obrigada pelos momentos de trabalho e dedicação, pelo conhecimento transmitido e por direcionar-me sempre para o caminho certo. É uma pessoa inestimável não só pelo caráter como, pelo fato de ser um exemplo de profissional.

A minha mãe Neusa, obrigada pela sua dedicação e pelo seu amor. Agradeço por toda a tua ajuda nos momentos difíceis que sempre me inspirou segurança e força de vontade. Sou extremamente grata por poder conviver com uma pessoa tão especial que é você. Obrigada por tudo!

Ao meu irmão e fiel conselheiro, Fabrício, obrigada pelo carinho, apoio e cuidado. Sou muito grata por saber que tenho você como irmão, alguém que eu sei que vai estar ao meu lado me incentivando e transmitindo força.

A minha grande amiga e ex-colega de laboratório, Eliza, que mesmo longe se manteve presente em todos os momentos. Obrigada pela tua amizade e companheirismo, nunca vou esquecer a minha dupla dinâmica de laboratório!

Ao meu amigo e colega de laboratório, Alencar, obrigada pela tua amizade e coleguismo. Sou muito grata pela tua companhia em momentos árdios de trabalho, onde as horas difíceis eram simplificadas com bom humor e diversão.

A equipe da cultura celular, Professor Olmiro, Charles, Pauline, Sabrina e Verônica, pelo auxílio e companheirismo.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Biogenômica, obrigada por toda a ajuda e carinho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica toxicológica, por oferecer a nós alunos um curso de inestimável qualidade.

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por ser uma referência de qualidade e excelência em formação.

A CAPES pela bolsa concedida.

Àqueles que não foram citados, mas que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE *IN VITRO* DA CAPACIDADE GENOMODIFICADORA DE COMPOSTOS QUÍMICOS E SINTÉTICOS

Autora: Francine Carla Cadoná

Orientadora: Prof^a Dra Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Data e local da defesa: Santa Maria, 16 de julho de 2013.

Pelo fato do DNA ser uma molécula suscetível ao ataque muitas de substâncias, estudos sobre efeitos tóxicos ou fitoterapêuticos de compostos químicos são necessários. Muitos ensaios que analisam o efeito genomodificador de substâncias, às vezes, são relativamente complexos, como o Teste do Cometa. Entende-se por ação genomodificadora aquela em que a substância testada ou apresenta genoproteção ou genotoxicidade. Baseado na existência de ensaios *in vitro* que servem como triagem para avaliar a capacidade antioxidante de um dado composto, como o DPPH, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método *in vitro* da capacidade genomodificadora de compostos químicos e sintéticos. Assim, um ultrasensível e rápido protocolo que não utiliza sistemas biológicos foi desenvolvido para a quantificação do DNA dupla-fita (dsDNA) exposto a substâncias químicas, denominado de Teste GEMO (Teste de Capacidade Genomodificadora). Esse método foi concebido para placa preta de 96 poços, utilizando um corante altamente específico de dsDNA (PicoGreen®) e DNA purificado de timo de bezerro (dsDNA). O teste inclui um pró-oxidante de referência, peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – 3M), que permite a análise comparativa dos dados obtidos, classificando a substância testada em vários níveis de genotoxicidade e ainda se a mesma apresenta potencial de genoproteção. Para o desenvolvimento do teste foi utilizado um antioxidante bem conhecido pelo seu papel genoprotetor e antitumoral, a vitamina C em diferentes concentrações (0.1, 0.3, 1, 3 e 10 µg/mL). Para a validação do Teste GEMO, foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) e células de adenocarcinoma colorretal (HT29), expostas as mesmas condições que o teste proposto e submetidas a diferentes testes já bem descritos na literatura: Teste do Cometa Alcalino, MTT, DCFH-DA e TBARS. Os resultados mostraram alta correlação com Teste GEMO, confirmando a validação. Portanto, o ensaio desenvolvido nesse trabalho oferece alta sensibilidade para detectar compostos genomodificadores, sem a interferência de sistemas biológicos.

Palavras-Chave: Teste GEMO. dsDNA. PicoGreen®. Genotoxicidade. Genoproteção. Substâncias genomodificadoras.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry
Toxicological
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR *IN VITRO* ANALYSIS OF GENOMODIFIER CAPACITY OF CHEMICALS AND SYNTHETIC

Author: Francine Carla Cadoná

Advisor: Prof^a Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, June 16, 2013.

DNA is a molecule susceptible to the attack of many toxic substances. So, studies on the toxic effects of chemical are very important. Tests that evaluate substances genomodifier (presenting action genoprotetora or genotoxic), how the Comet Assay, are often complex and laborious. Therefore an ultrasensitive and fast protocol no-cell is presented for the quantification DNA triggered by chemical compounds, called GEMO Assay (Genomodifier capacity assay). This assay includes a prooxidant standardized (H₂O₂, 3M) that is used to compare the effects on dsDNA damage of the compound-test that is evaluated with and without addition this prooxidant. The assay is performed in black 96-well plate and use Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and DNA from Calf Thymus. The vitamin C was used like compound-test in different concentrations (0.1, 0.3, 1, 3 and 10 µg/mL). For validation of GEMO Assay was used PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) and HT29 (colon carcinoma cell line) exposed the same conditions that the proposed test and evaluated at different tests already well described in the literature: Alkaline Comet Assay, MTT, DCFH-DA and TBARS. The results showed high correlation with GEMO Assay, confirming the validation. Then the test developed in this work offers high sensitivity for detecting genomodifier substances without interference if biological systems.

Keywords: GEMO Assay. dsDNA. PicoGreen®. Genotoxicity. Genoprotective. Genomodifier substances.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Bases conceituais da genética toxicológica.....	10
1.2 Relevâncias de ensaios para a análise da genotoxicidade	11
1.2.1 Teste de Ames	12
1.2.2 Quantificação da 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.....	13
1.2.3 Ensaio da Instabilidade Cromossômica.....	14
1.2.4 Teste de Micronúcleos	15
1.2.5 Teste do Cometa.....	16
1.3 Limitações associadas aos testes com modelos biológicos	18
1.4 Desenvolvimento de um teste genotóxico utilizando DNA dupla fita.....	20
1.4.1 Princípio do Teste GEMO.....	21
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
3. RESULTADOS.....	26
4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bases conceituais da genética toxicológica

O DNA caracteriza-se como uma molécula consideravelmente estável, porém pode sofrer alterações induzidas por agentes físicos, químicos ou microbiológicos, que são denominados substâncias mutagênicas. Essas substâncias podem ter origem ambiental ou ocupacional, como, por exemplo, a radiação ultravioleta, os agrotóxicos, o asbesto, o cigarro, o sedentarismo e a obesidade (KOHATSU et al, 2007).

A geração de dano no DNA (genotoxicidade) é considerada um evento inicial de muitas morbidades humanas com destaque à carcinogênese. Muitos compostos genotóxicos têm a capacidade de alterar rotas de sinalização da célula, o ciclo celular, promover a resistência a apoptose, inibir o reparo do DNA, alterar processos de metilação (efeito epigenético) e aumentar o estresse oxidativo via distúrbio no equilíbrio pró e antioxidante corporal (TAJBAKHSI, 2011).

A genotoxicidade pode ocorrer de maneira direta, quando a substância mutagênica interage diretamente com o DNA promovendo lesões, ou pode ser gerada indiretamente, que ocorre quando moléculas genotóxicas estimulam um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os EROs são capazes de interagir com componentes celulares, como a mitocôndria e a membrana celular, afetando a segurança do DNA (BERLO et al., 2012).

A genotoxicidade pode ser causada pela exposição ambiental a elementos radioativos, como o urânio. A ingestão de alimentos contaminados por esse metal pode comprometer a saúde humana, podendo lesar o DNA e aumentar a incidência de neoplasias gastrointestinais, já que, por exemplo, o câncer colorretal (células HT29) está diretamente relacionado com a nutrição (KNOBEL et al., 2006).

Muitos compostos genotóxicos de origem ambiental ou ocupacional, como, por exemplo, o arsênico, que é encontrado em herbicidas, pesticidas, corantes e medicamentos, podem estimular o aumento da produção de EROs, que em concentrações fisiológicas exercem efeitos biológicos importantes, porém em altas

concentrações podem induzir modificações na molécula de DNA, como aneuploidia, formação de micronúcleos, aberrações cromossômicas, mutações por deleção, troca de cromátides irmãs e inibição de mecanismos de reparo. Estudos retratam que a exposição crônica a esse tipo de composto genotóxico acarreta em danos oxidativos no DNA de leucócitos, o que interfere no ciclo celular e pode desencadear doenças cardiovasculares e neoplásicas (FAITA et al., 2013).

Adicionalmente, outra molécula genotóxica que está associada com a carcinogênese, é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser um produto gerado pelo estresse oxidativo, que ocorre quando há um desbalanço do sistema antioxidante e o do pró-oxidante. O H_2O_2 na presença de metais de transição como o Ferro (Fe^{2+}) pode gerar o radical hidroxil (HO^{\bullet}) pela Reação de Fenton. O HO^{\bullet} é considerado o principal agressor ao DNA, pois reage com as quatro bases nitrogenadas, produzindo mutações, como, por exemplo, a modificação química da base guanina do DNA (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) e também pode gerar quebras na cadeia do DNA e de sítios apurínicos/apirimidínicos (KLUNGLAND & BJELLAND, 2007).

1.2 Relevâncias de ensaios para a análise da genotoxicidade

Preocupações a respeito da saúde humana têm estimulado o uso cada vez maior de testes que indiquem toxicidade genética, para identificar agentes mutagênicos e caracterizar os seus efeitos. A indução de mutações em células germinativas, que pode tanto afetar o desempenho reprodutivo dos indivíduos e assim comprometer as gerações futuras, quanto gerar alterações em células somáticas, que podem prejudicar o ciclo celular e com isso, aumentar o risco de comprometimentos neoplásicos (PROVOST et al., 1993).

A genotoxicidade não é uma medida de carcinogênese, no entanto é frequentemente relacionada como um indicador para o câncer, já que os testes de mutagenotoxicidade medem acúmulos de lesões na molécula de DNA, que é um evento inicial para o desenvolvimento de células neoplásicas. Como há uma alta associação entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e a

carcinogênese, os testes de genotoxicidade são utilizados rotineiramente para uma varredura do espectro toxicológico de substâncias químicas e medicamentos, e também para a descoberta de genoprotetores para o uso cotidiano da prevenção de mutações ao DNA (NIWA et al., 2013).

Por este motivo, investigações sobre os efeitos genomodificadores, de compostos relacionados com o metabolismo oxidativo celular que agem no DNA ou protegendo (genoproteção) ou danificando (genotoxicidade) são de grande interesse científico, ecológico e clínico. Portanto, existe uma bateria considerável de testes para a detecção de efeitos genotóxicos e também genoprotetores de compostos químicos e fitoterápicos, no qual células ou modelos experimentais animais são expostos a agentes genotóxicos ambientais, ocupacionais ou farmacológicos.

1.2.1 Teste de Ames

O ensaio Salmonella/microssoma, conhecido como teste de Ames, é muito utilizado para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Essa técnica é indicada principalmente para estudos de triagem, pois colônias de bactérias tem se mostrado eficientes na detecção de um grande número de mutágenos, sendo uma ferramenta rotineira para detectar agentes químicos com potenciais para induzirem mutações reversas (TEJS et al., 2008).

Diferentes tipos de amostras podem ser analisadas a fim de identificar características mutagênicas. As amostras ambientais líquidas como água bruta, tratada e/ou efluentes podem ser testadas diretamente após esterilização por membrana filtrante. Também podem ser investigados extratos orgânicos, usando métodos para determinar o grupo de substâncias químicas presentes, assim como, amostras ambientais sólidas e de material particulado do ar (KUMMROW et al., 2010).

O ensaio baseia-se no princípio que linhagens de bactérias auxotróficas, para histidina (his-), ou seja, que são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo sem histidina, a menos que ocorram mutações reversas que restaurem a síntese

desse aminoácido. A avaliação da frequência da mutação reversa é medida através da observação do crescimento das colônias em placas de cultura. A contagem do número de colônias é realizada após a exposição de uma população de células a um agente mutagênico, como está ilustrado na figura 1 (JANTOVA et al., 2013).

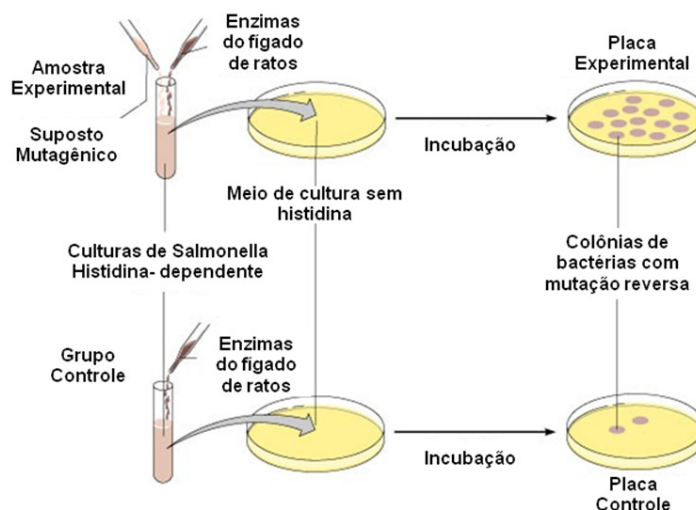


Figura 1 - Teste de Ames (CUMMINGS, 2006).

1.2.2 Quantificação da 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

O DNA pode sofrer ataque e mutações de diferentes moléculas e substâncias químicas, como as EROs. Como resultado da oxidação do DNA por essas moléculas, principalmente pelo radical hidroxil (OH^{\bullet}), pode ser gerado uma mutação na base nitrogenada guanina do DNA (adição na posição 8), dando origem a modificação química permanente, a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (figura 2), que pode ser removida por ação de enzimas de excisão, constituindo assim um marcador biológico da ação de agentes genotóxicos sobre o DNA (FISCHER et al., 2013).

Essa molécula mutante pode ser detectada por *High Performance/Pressure Liquide Chromatography* (HPLC-MS) ou por Ensaio Imunoenzimático (ELISA), em

amostras biológicas, como urina, soro, cultura de células e tecidos humanos e animais (DEL et al., 2005).

Essa técnica é amplamente utilizada para a detecção de mutagênicos, com implicações em estudos clínicos, associados à idade e ao câncer, por ser altamente sensível e específica. Porém, é um ensaio de alto custo e laborioso.

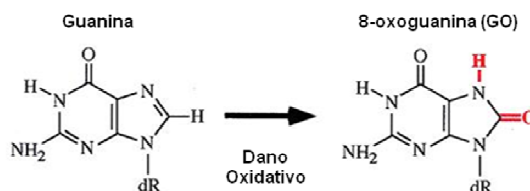


Figura 2 - 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (WANG et al, 2005).

1.2.3 Ensaio da Instabilidade Cromossômica

Outro método eficaz, do ramo da citogenética, para a avaliação de quebras cromossômicas e mutações, é o ensaio da instabilidade cromossômica. A análise do cariótipo pode fornecer resultados expressivos de genes que estão envolvidos na gênese e crescimento de vários tipos de câncer, assim como, apontar para compostos nocivos ao DNA (STIRLING et al., 2011).

Por meio desse ensaio, pode-se investigar se a exposição do DNA a um determinado fármaco ou extrato químico, por exemplo, pode induzir mudanças no índice mitótico e instabilidade cromossômica avaliadas pela banda G, realizado por análise de microscopia óptica, que é o método padrão mais comumente usado para detectar anormalidades cromossômicas (YUNIS, 1978).

Os núcleos encontrados na linha central da lâmina são contados e classificados quanto à ocorrência de núcleos intactos (em interfase ou prófase), metáfases intactas, e três indicadores de instabilidade cromossômica: cromossomas quebrados, cariopcnose e cariólise. O cariopcnose é caracterizado por uma

condição causada pelo encolhimento citológico do núcleo de uma célula com a condensação de cromatina. A cariólise é gerada pela fragmentação destrutiva do núcleo de uma célula a morrer, onde a sua cromatina é distribuída irregularmente ao longo do citoplasma, que ocorrem como resultado de qualquer morte celular programada ou necrose (BIGGER & SAVAGE, 1975). A figura 3 é uma imagem representativa da visualização dos cromossomos para a análise da instabilidade cromossômica.



Figura 3 - Ensaio da Instabilidade Cromossômica (OSTROVSKY, 2007)

1.2.4 Teste de Micronúcleos

Outro método bastante usado *in vivo* para a detecção de genotoxicidade é o teste de micronúcleos. Essa técnica é utilizada desde 1970, principalmente em linfócitos do sangue periférico e em células epiteliais esfoliativas, com o objetivo de detectar agentes clastogênicos (que causam quebras cromossômicas) e de agentes que induzem aneuploidia (perda de cromossomos inteiros). Tanto as alterações numéricas quanto as estruturais estão associadas com o surgimento e progressão de tumores, e com efeitos reprodutivos adversos (RAMIREZ, et al., 2001).

Os micronúcleos são núcleos pequenos que se originam de fragmentos cromossômicos, como resultado de quebras cromossômicas ou de um cromossomo inteiro que se desprende do fuso. Assim, por meio desse método, pode ser identificada a presença de danos em cromossomos induzidos por agentes genotóxicos, os quais atuam interferindo na formação do fuso mitótico, o que pode

afetar a distribuição equitativa dos cromossomos na divisão celular (RAMIREZ et al., 1999).

Essa técnica é indicada para avaliar o efeito genotóxico em diferentes situações, como más condições de cultura celular, senescência e variabilidade na resposta das células a um agente estressor (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). As lesões no DNA são avaliadas através do microscópio óptico e classificadas da seguinte maneira: Micronúcleos (MNs), Células Binucleadas (BNs), Pontes Nucleares (PNs), *Buds* nucleares (BUD) ou “*Broken eggs*”, como retrata a figura 4.

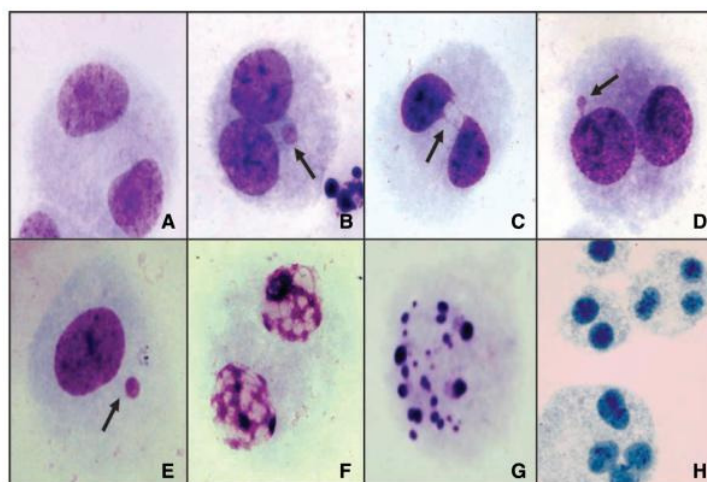


Figura 4 – Imagem representativa de células analisadas pelo Teste de Micronúcleos: (A) Célula normal, (B) célula binucleada com micronúcleo, (C) célula binucleada com pontes nucleadas, (D) célula binucleada com buds, (E) células mononucleadas com micronúcleos. (F) célula necrosada, (G) célula em apoptose, (H) células polinucleadas (EL-ZEIN et al., 2008).

1.2.5 Teste do Cometa

O teste do cometa é uma técnica utilizada para medir quebras de fita dupla e simples do DNA em células individuais. Esse é um teste amplamente utilizado no biomonitoramento humano e ecológico, na quantificação da apoptose e na detecção

da genotoxicidade de substâncias químicas como produtos farmacêuticos e agroquímicos (GARCÍA et al., 2004).

Nesse ensaio, células ou núcleos individualizados são suspensos em gel de agarose líquida, de baixo ponto de fusão, colocadas em uma lâmina de microscopia, lisadas com detergentes e altas concentrações de sais, para que assim, o DNA liberado migre por eletroforese em um tampão neutro ou alcalino.

Então, rupturas das hélices dupla fita do DNA superenovelado conduzem à redução do tamanho da grande molécula e estes fragmentos podem ser deslocados pela eletroforese. Além disso, sob condições altamente alcalinas há desnaturação, desenrolando o DNA dupla fita e, com isso, ocorre a exposição de sítios lábeis alcalinos como quebras de fita simples. A formação dos cometas, que confere o nome a técnica, acontece conforme as extremidades quebradas da molécula de DNA, carregadas negativamente, tornando-se livres para migrar no campo eléctrico em direção ao ânodo formando um rastro da cauda do DNA, que lembra um cometa (FIKROVÁ et al., 2011).

Quanto mais lesionado estiver o DNA, mais rápido os pequenos fragmentos irão migrar na eletroforese e maior será a cauda do cometa. Através do microscópio óptico, podem ser visualizados cometas de vários tamanhos, o que indica o seu respectivo dano. As lâminas são analisadas por dois pesquisadores diferentes, totalizando uma contagem de 50 cometas por lâmina e os danos são classificados em 4 níveis: de 0 (nenhum dano) a 4 (dano máximo), como está ilustrado na figura 5. (SINGH et al., 1988).

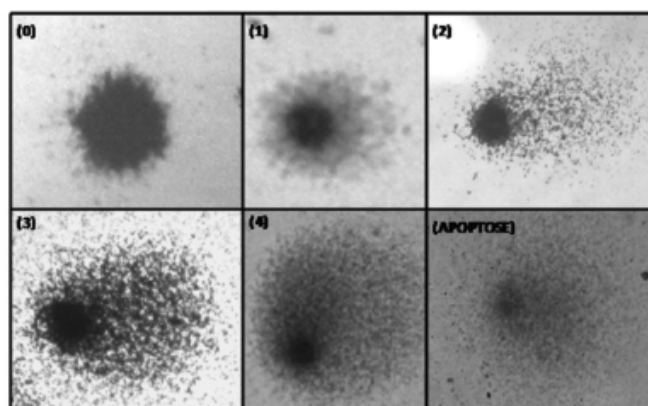


Figura 5 - Teste do Cometa (FRONZA et al., 2010).

1. 3 Limitações associadas aos testes com modelos biológicos

Aparentemente, a utilização de cultura de células é a melhor maneira de avaliar efeitos de genotoxicidade ou genoproteção gerada por compostos químicos. Linhagens celulares são muitas vezes preferidas por alguns laboratórios com base na facilidade de manuseamento de estoques congelados de células, o que torna o método prático e de fácil acesso. No entanto, o desenho experimental é crucial para a geração de resultados precisos e de avaliação do potencial genotóxico da substância investigada. Portanto, a escolha do sistema celular, a duração do tratamento, a utilização de um bloqueador de citocinese, a classe do composto de teste ou a adição de componentes metabólicos pode influenciar significativamente os resultados do ensaio (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Apesar da relevância do uso destes modelos biológicos, variações genéticas relacionadas com o metabolismo celular e do organismo, podem produzir resultados toxicológicos ou farmacológicos superestimados ou subestimados. Por exemplo, vários estudos têm sugerido que a variação genética apresentada no gene da superóxido dismutase dependente de manganês humano (Ala16Val-SOD2) estão associados à maior susceptibilidade de desenvolver neoplasias, como, câncer de próstata, mama e pulmão (TAUFER et al., 2005; ZEJNILOVIC et al., 2009; MAO et al., 2009; BICA et al., 2010). No entanto, esta associação também é influenciada por fatores ambientais como dieta, hábito de fumar e exposição ocupacional (AMBROSONE et al., 1999; CAI et al., 2004; TAMIMI et al., 2004; HUNG et al., 2004). Com base nestes resultados *in vitro*, investigações considerando o polimorfismo Ala16Val-SOD2 foram realizadas, mostrando interferência na resposta toxicológica (MARTIN et al., 2008; MONTAGNER et al., 2010; COSTA et al., 2012).

Os testes de rotina, mais comumente utilizados para a varredura das lesões são os sistemas de mutação gênica em bactérias (Teste de Ames) e os de alteração gênica (Ensaio Cometa Alcalino, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) e cromossômica (Teste de Micronúcleos, Ensaio da Instabilidade Genômica) em cultura de células. Existe um grande número de razões para que esses testes sejam amplamente utilizados, incluindo baixo custo, alta sensibilidade, reprodutividade bem documentada e habilidade de identificar corretamente carcinógenos químicos.

Os testes que utilizam colônia de bactérias como modelos experimentais tem suas vantagens e suas desvantagens. A grande vantagem do uso da bactéria é pelo fato desse organismo ser bastante simples, já que possui um único cromossomo circular no seu interior e assim, não apresenta a complexidade dos cromossomos humanos. Outra vantagem é a ausência da membrana nuclear, o que potencializa a interação dos compostos com o DNA. Adicionalmente, as bactérias não são capazes de realizar divisão mitótica, isso permite que a interação com o DNA possa estar diretamente relacionada com os compostos mutagênicos, ou seja, se ocorrer algum dano na estrutura do DNA é por conta da ação direta e indireta do composto estudado (AMES et al., 1975).

A utilização de bactérias também apresenta muitas desvantagens, pois o seu simples cromossomo é estruturalmente e funcionalmente diferente dos mamíferos, então, muitas vezes, compostos mutagênicos que poderiam induzir mutações mais prejudiciais ao DNA, como, por exemplo, recombinações ou não-disjunções, não seriam detectadas em bactérias. Outra desvantagem dessa técnica ocorre pelo fato de que muitas enzimas complexas presentes nos mamíferos, como a família das enzimas do citocromo P450, não são encontradas nas bactérias, responsáveis pela metabolização de xenobióticos, já que muitos agentes químicos só se tornam mutagênicos quando são metabolizados por enzimas como essas. Para simular o sistema de ativação metabólica de agentes xenobióticos, enzimas precisam ser extraídas do fígado de ratos e são combinadas com cofatores enzimáticos e então, incubadas com o agente químico teste em conjunto com a bactéria. Além de ser necessário tratar animais e depois extrair a parcela enzimática, há uma quantidade enorme de agentes químicos que não serão metabolizados por esse sistema *in vitro* e ainda, muitos compostos metabolizados podem gerar metabólitos diferentes dos encontrados *in vivo* (AMES et al., 1973).

Os testes que visam detectar danos à molécula de DNA, utilizando células como material biológico, também apresentam pontos positivos e negativos. Um exemplo disso é o Teste do Cometa, que é um método versátil e relativamente barato para a avaliação da genotoxicidade. Pode ser utilizado praticamente com qualquer tipo de célula nucleada e de qualquer espécie. Entretanto, esse teste apresenta muitas limitações, pelo fato de ser uma técnica extremamente laboriosa, já que necessita de vários dias para a obtenção dos resultados finais, que são semi-quantitativos e dependentes da capacitação do pesquisador na interpretação dos

danos observados. Além disso, o comprimento da cauda do cometa, que é uma medida de genotoxicidade, pode ser influenciado por vários fatores, tais como o tempo de desenovelamento do DNA antes da eletroforese e as condições eletroforéticas (FAIRBAIRN et al, 1995).

Outro teste que utiliza células e tem as suas vantagens e desvantagens é o Teste de micronúcleos. Essa técnica é bastante vantajosa, pois é relativamente barata, pode ser usada qualquer população celular em proliferação. No entanto, precisa-se de pesquisadores treinados e capacitados para avaliar os diferentes tipos de danos genéticos encontrados, em conjunto com a necessidade de contar 1000 células em cada lâmina, que torna a técnica laboriosa e demorada (TORRES-BUGARÍN et al, 2007).

Diante disso, ensaios que visam detectar substâncias genotóxicas ou genoprotetoras, que utilizam modelos experimentais biológicos podem estar sujeitos a sofrer algum tipo de variação genética e de condições experimentais, o que pode interferir diretamente nos resultados. Além disso, muitas vezes, ensaios desse tipo, podem dispendir alto custo e muito tempo de trabalho, como, é descrito por Mahadevan e colaboradores (2011), o uso de mais de 800 camundongos e ratos em conjunto com a análise histopatológica de mais de 40 tecidos, para a detecção do potencial carcinogênico de substâncias químicas. Por isso, o desenvolvimento de um ensaio rápido, muito sensível, barato, que oferece resultados quantitativos, que evita a subjetividade do analisador e que não utiliza material biológico para a avaliação da capacidade genotóxica ou genoprotetora de químicos é muito relevante.

1. 4 Desenvolvimento de um teste genotóxico utilizando DNA dupla fita

Um teste de triagem com a molécula de DNA pode ser uma ferramenta útil para estudos toxicológicos e farmacológicos, já que análises primárias *in vitro* que indicam potenciais efeitos genotóxicos de alguns compostos químicos ou extratos de plantas, sem interferência de variáveis metabólicas celulares e fisiológicas como a

reparação de DNA, metabolismo oxidativo, absorção e desintoxicação é de grande relevância.

Embora os ensaios de genotoxicidade estejam bem estabelecidos e são produzidos resultados consistentes a partir de modelos *in vivo*, as limitações desses testes, como, de custo e de tempo, corroboram para a necessidade de desenvolvimento de testes rápidos, que permitam uma análise preliminar da potencial capacidade mutagênica e genoprotetora de algum determinado produto químico.

Testes bioquímicos que utilizam moléculas ao invés de modelos experimentais já existem e são amplamente utilizados como indicadores de determinados efeitos biológicos. Este é o caso da técnica de sequestros de radicais livres DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), inicialmente proposta por Brand-Willians et al. (1995). Esse método baseia-se no uso de um pró-oxidante sintético de coloração púrpura (DPPH), que é capaz de ser reduzido pela ação de substâncias antioxidantes a difenil-picril-hidrazina, que apresenta cor amarela.

Com base nesse contexto, e na existência de técnicas *in vitro* de triagem que não empregam modelos celulares e animais, como o teste do DPPH, nesse trabalho foi desenvolvido um ensaio simples, rápido e preciso que utiliza a molécula de fita dupla de DNA (dsDNA) para avaliar a potencial capacidade genomodificadora de compostos químicos, sendo de grande utilidade em investigações iniciais de novas moléculas químicas, extratos fitoterápicos ou suplementos alimentares, bem como para identificar o grau de concentração que estes efeitos são detectados.

Esse novo e ultrasensível ensaio foi denominado de Teste GEMO (Teste de capacidade genomodificadora). O nome do método é baseado no fato de que algumas substâncias são capazes de apresentar propriedade genotóxicas ou genoprotetoras, ou seja, podem ser substâncias genomodificadoras.

1. 4. 1 Princípio do Teste GEMO

O desenvolvimento do Teste GEMO é potencialmente factível a partir da síntese e comercialização de corantes altamente específicos do DNA de dupla fita

(dsDNA) como é o caso do Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen). O corante PicoGreen® é um reagente fluorescente ultrasensível que possibilita a quantificação de duplas fitas de DNA em solução, podendo detectar concentrações ínfimas de DNA, como de até 25 pg/mL. Esse reagente é um corante de cianina assimétrica, muito sensível ao pH, apresentando maior eficácia entre os pH 7 a 8, sendo que fora dessa gama o sinal fluorescente diminui rapidamente (DRAGAN et al, 2010).

O PicoGreen® apenas emite fluorescência quando se liga com o dsDNA, ou seja, se esse reagente não está ligado à molécula de DNA não apresenta coloração e, conseqüentemente, não é detectada fluorescência (AHN et al, 1996). A propriedade seletiva do PicoGreen® para dsDNA é usada para indicar desnaturação da molécula do DNA, através da diminuição do sinal da fluorescência, proporcional a produção de DNA fita-simples (ssDNA) e nucleotídeos livres, quando o dsDNA é atacado por uma substância genotóxica.

A capacidade de se ligar somente a duplas fitas, evita interferência de contaminações, como moléculas de RNA e, com isso, falsos resultados são reduzidos. Adicionalmente, a utilização de DNA purificado obtido comercialmente para testar efeitos genomodificadores seria um elemento fundamental para o desenvolvimento do teste. Isto porque seria possível avaliar a ação direta do composto na molécula de DNA sem outros interferentes bioquímicos estruturais e funcionais da célula.

O uso do PicoGreen® e do DNA purificado poderia também representar um ensaio bastante rápido, de menor custo pois utiliza baixa quantidade de amostra (HÁ et al, 2011) e com resultados quantitativos (absorbância fluorimétrica) quando comparado com outros testes genotóxicos, como com o Teste do Cometa.

O Teste GEMO é constituído por duas reações químicas para a detecção de substâncias genomodificadora. A primeira reação é baseada na seguinte equação: $F = dsDNA + CT + PicoGreen®$, onde uma estipulada concentração de dsDNA é exposta a um composto teste investigado (CT). A fluorescência (F) é dada nos seguintes comprimentos de onda: 480 nm de excitação e 520 nm de emissão. Moléculas ou extratos que causam quebras no dsDNA são identificados pela diminuição da fluorescência quando comparado com o grupo controle que havia apenas o dsDNA.

A segunda reação tem como finalidade analisar a capacidade de genoproteção e é baseada na subsequente equação: $F = \text{dsDNA} + \text{GS} + \text{CT} + \text{PicoGreen}^{\text{®}}$. Como na primeira equação, F é estipulada em 480 nm de excitação e 520 nm de emissão. Utiliza-se a mesma concentração de dsDNA que a primeira equação, a qual é exposta a um CT investigado na presença de um pró-oxidante definido como referência (GS). Se CT tiver a capacidade de proteger o dsDNA da possível degradação promovida pelo GS, a fluorescência vai aumentar quando comparada com os valores resultantes do tratamento do dsDNA exposto apenas ao GS. A genoproteção pode ser total (se a fluorescência for similar ao grupo controle) ou parcial (se a fluorescência for maior que o GS tratamento e menor que o grupo controle).

Considerando que muitos tipos de substâncias têm ação genotóxica, é essencial que seja definida a categoria de moléculas químicas que podem ser testadas usando o Teste GEMO. Na natureza há uma grande quantidade de moléculas químicas que agem minimizando ou mesmo anulando a genotoxicidade, pois protegem o DNA de danos oxidativos, apresentando uma potente capacidade genoprotetora, é o caso de substâncias antioxidantes como, os polifenóis, os flavonóides, os carotenóides e algumas vitaminas. Essas moléculas são habitualmente ingeridas através da nossa dieta ou suplementação e o uso de extratos fitoterápicos (MOON & SHIBAMOTO, 2009).

Um exemplo de extrato que pode ser considerado genoprotetor é o Guaraná (*Paullinia cupana*), pois é constituído por muitos componentes antioxidantes. Além das propriedades antimicrobiana, anti-depressiva, anti-obsesogênica e energética (BITTENCOURT et al., 2011) estudos mostram que o Guaraná evita que o DNA sofra lesões a nível de bases nitrogenadas quando exposto a um pró-oxidante e também promove a redução da proliferação de células neoplásicas (FUKUMASU et al., 2008).

Os polifenóis têm atividade antitumoral e impedem que a carcinogênese se instaure através da inativação de possíveis moléculas causadoras de instabilidade genômica, como, por exemplo, as EROs (GERHAUSE, 2013). O mesmo se aplica a vitamina C, que é um dos antioxidantes mais conhecidos e estudados, pelo fato de prevenir injúrias celulares, como, a lipoperoxidação, instabilidade genômica e danos em outras moléculas biológicas.

No entanto, é também possível para a vitamina C atuar como um pró-oxidante, através da sua capacidade de interagir com metais de transição, sendo apta para oxidar o Fe^{2+} a Fe^{3+} , o que pode promover, assim, a reação de Fenton que, atuando em peróxidos, produz os radicais hidroxil extremamente reativos e danosos ao DNA (AZQUETA et al., 2013). Assim como a vitamina C, os polifenóis também podem gerar danos à estrutura do DNA em determinadas concentrações (FUKUSHIMA et al., 2005).

Compostos genoprotetores quando estudados *in vitro* ou *in vivo*, muitas vezes, podem apresentar o chamado Efeito Hormese. Esse fenômeno refere-se a uma curva em “U” ou “U invertido” dose resposta, ou seja, o mesmo composto pode apresentar diferentes resultados dependendo da sua concentração, por exemplo, em baixas concentrações um extrato pode desencadear uma ação antioxidante, em concentrações intermediárias não causar efeito ou ainda, em altas concentrações tornar-se tóxico (ZYCHLINSKY et al., 1992).

Por essa razão, o Teste GEMO foi primeiramente desenvolvido para testar antioxidantes naturais de compostos químicos que podem reverter danos oxidativos que causam injúrias ao DNA. Dessa forma, com o desenvolvimento e a implementação dessa técnica rápida e relativamente barata, novas substâncias genotóxicas e genoprotetoras poderiam ser encontradas, que são de interesse principalmente para as avaliações toxicológicas e de testes de eficácia e segurança de fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver um ensaio *in vitro* para a avaliação da capacidade genomodificadora de compostos químicos e sintéticos utilizando molécula pura de DNA dupla-fita através da comparação do teste com ensaio de genotoxicidade amplamente utilizado.

2.2 Específicos

Desenvolver um teste fluorimétrico de avaliação da capacidade genomodificadora (genotóxica/genoprotetora) de moléculas e compostos químicos utilizando molécula de DNA dupla-fita pura e corante de alta afinidade ao DNA dupla-fita, a partir da determinação:

- da molécula prooxidante a ser utilizada como referência química de genotoxicidade, sua concentração e seu tempo de exposição;
 - da estrutura geral do ensaio (principais etapas do método);
 - da análise e interpretação dos resultados obtidos.
- Comparar o teste desenvolvido através da comparação dos resultados obtidos com o referido ensaio e com os ensaios genotóxicos e citotóxicos *in vitro*, utilizando células saudáveis e neoplásicas.

3. RESULTADOS

Os resultados referentes a esta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito a seguir. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação do manuscrito está baseada na versão submetida à revista *Toxicology in Vitro*, com o título de “*Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds*”.

Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds

Francine Carla Cadoná¹, Maria Fernanda Manica-Cattani², Alencar Kolinski Machado⁴, Raul Moreira Oliveira², Eliza Ribas da Silveira Flôres³, Charles Assmann², Thais Doeller Algarve¹, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1, 2, 4*}

¹ Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria. fran.cine.bio@hotmail.com

² Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. marymanica@yahoo.com.br, raul.moreira.oliveira@gmail.com, charles.ufsm@gmail.com, thais.algarve@gmail.com

³ Programa de Pós-Graduação em Patologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. elizarsf@gmail.com

⁴ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. alencarkolinski@yahoo.com.br

* Corresponding author: IBM Cruz. Av Roraima 1000, Predio 19, Santa Maria-RS, Brazil. Zip Code 97105-900, Phone: 55-55- 32208163, Fax: 55-55- 32208239, Email: ibmcruz@hotmail.com

Abstract

We describe here an ultrasensitive and fast protocol called a GEMO Assay (Genomodifier capacity assay). This non-cell method was developed to identify chemicals with genomodifier (genotoxic and/or genoprotective) capacity. The assay is performed in a black 96-well plate using dsDNA exposed to different concentrations of chemicals tested (CT) with and without the addition of a prooxidant substance that causes acute dsDNA damage (H_2O_2). Chemicals that cause a break in dsDNA are identified by a decrease in fluorescence in comparison with the fluorescence observed in an untreated dsDNA indicating a genotoxic capacity. On the contrary, attenuation of dsDNA degradation caused by H_2O_2 exposition indicates CT genoprotective capacity. The GEMO Assay was validated by comparing peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and an HT29 colorectal cell line exposed to similar conditions where the effect on dsDNA was also evaluated by a DNA Alkaline Comet Assay. Vitamin C was used as CT and other variables were also evaluated to confirm the cytotoxic action of H_2O_2 . The results showed a strong negative correlation between the GEMO Assay and the Comet Assay performed in PBMCs. Therefore, the GEMO Assay could be useful to screening of genoprotective and genotoxic effects of chemicals without interfering cell biological variables.

Keywords: GEMO Assay, dsDNA, genotoxicity, genoprotective, DNA Comet Assay.

INTRODUCTION

Mammalian cells under normal growth conditions are subject to several thousand DNA injuries per day which include base loss, base alterations, and strand breakage. Therefore, the generation of DNA damage (genotoxicity) could be considered the main event that causes several human morbidities with an emphasis on cancer due to environmental, occupational or pharmacological variables (Alavanja and Bonner, 2012).

The harmful effects of genotoxic compounds are related to the ability of these substances to alter cell signaling pathways, cell cycles, strength promoting apoptosis, inhibit DNA repair, alter methylation processes (epigenetic effect) and increase the oxidative stress that occurs in arsenic (Flora, 2011), heavy metals (Xie et al., 2011) and mercury (Crespo-López et al., 2009) exposure.

For this reason, toxicological screening of chemical compounds and drugs with pharmacological interest and the regulatory battery of drugs includes genotoxicity tests. Several *in vitro* and *in vivo* assays for genotoxicity have been developed that, with a range of endpoints, detect DNA damage or its biological consequences in prokaryotic (AMES test) or eukaryotic (e.g. mammalian, avian or yeast) cells. These assays are used to evaluate the safety of environmental chemicals and consumer products and to explore the action or mechanism of known or suspected carcinogens (Charoensin et al., 2012).

However, all assays use biological systems to test DNA damage. However, almost test involve several laboratorial steps and some difficulties to interpreted the results.

This is the case of DNA Comet assay (Ostling and Johanson, 1984; Singh et al., 1988).

Therefore, primary *in vitro* analysis could to indicate potential genotoxic effects of some chemical compounds or plant extracts with toxicological and/or pharmacological interest without interference of cellular and physiological metabolic variables like DNA repair. However, we offer a description here of a fast and inexpensive non-cell *in vitro* fluorimetric assay that uses pure double-strand DNA molecules (dsDNA) to detect the genotoxic and/or genoprotective capacity of a specific single chemical compound or of plant extracts called “Genomodifier capacity assay” (GEMO assay). The name of the assay is based on the fact that some substances have genotoxic and/or genoprotective properties (Genomodifier substances) that need to be identified to evaluate their toxicological or pharmacological potential.

The concept of the Genomodifier Capacity test (GEMO assay)

The development of the GEMO Assay was based on the DPPH (1, 1-Diphenyl –2-picrylhydrazyl) method used to quickly estimate the antioxidant capacity of some substances or extracts. DPPH is a well-known synthetic radical and a scavenger of other radicals. In this non-cell assay, the rate of the reduction of a chemical reaction upon the addition of DPPH is used as an indicator of the radical nature of that reaction. Because of a strong absorption band centered at about 520nm, the DPPH radical has a deep violet color in the solution, and becomes colorless or pale yellow when neutralized. This property allows visual monitoring of the reaction, and the

number of initial radicals can be counted from the change in the optical absorption at 520nm or in the EPR signal of the DPPH (Sharma and Bhat, 2009).

The assay described here uses pure dsDNA (calf thymus DNA) and a highly specific dsDNA dye (PicoGreen®) as the basic reagents. PicoGreen® dye is an ultrasensitive fluorescent reagent that allows quantification of dsDNA in the solution and can detect minute concentrations of DNA, up to 25 pg/mL (Ahn et al., 1996). The fluorescence determined by a specific fluorochrome dye (PicoGreen®) is used to estimate if the compound-test presents some level of interference in dsDNA molecules that indicate genotoxic or genoprotective effects. The PicoGreen® dye makes a very stable complex with dsDNA in alkaline conditions instead of ssDNA (single-strand DNA), proteins, SDS, and urea. The PicoGreen® characteristic selectivity is used to follow DNA denaturation with decreasing fluorimetric signal intensity proportionate to the production of ssDNA and mononucleotide content when dsDNA is attacked by some chemical molecule or environmental variable at higher temperatures (Levy et al., 2000).

Therefore, the GEMO Assay is constituted for two chemical reactions to access the genotoxic and genoprotective capacity of some specific chemical or extract (chemical-test, CT). The first reaction is based on the follow equation: $F = \text{dsDNA} + \text{CT}$ where F = fluorescence at 480nm excitation and 520nm emission determined from a known dsDNA concentration exposed to some chemical-test (CT) that can be pure molecules or extracts. Molecules and extracts that cause a break in dsDNA are identified by decreasing the fluorescence in comparison to the fluorescence observed in the untreated dsDNA (control group). The second reaction that analyzes the genoprotective capacity of some molecule or extract is based on the following equation: $F = \text{dsDNA} + \text{GS} + \text{CT}$ where F = fluorescence at 480nm excitation and

520nm emission is determined from a known dsDNA concentration exposed to some CT in the presence of a genotoxic standard molecule (GS). If the CT has a protective effect, the dsDNA degradation promoted by the GS molecule will be prevented and the fluorescence will increase when compared to a dsDNA treated just with GS. The genoprotective capacity can be complete (if the fluorescence is similar to the control group) or partial (if the fluorescence is higher than the GS treatment and lower than the control group).

When establishing which category of chemical molecules will be tested by GEMO Assay, it is important to consider that several types of molecules have genotoxic action. It is important to discriminate between genotoxic carcinogens and non-genotoxic chemicals because their mechanisms of action are quite distinct. Their dose-response curves, reversibility, and organ and species-specificity are also quite distinct. Thus, the mechanism of action of the agents involved in mutagenesis related to cancer causation and development needs careful analysis. There are a large number of molecules in nature chemically classified as antioxidants that present potent antigenotoxic effects. This is the case of polyphenols as well as some vitamins habitually ingested from our diet or by supplementation and/or use of phytotherapeutic compounds. Polyphenols have several anticancer effects such as blocking carcinogenesis initiation by inactivation of exogenous or endogenous genotoxic molecules including reactive oxygen species (ROS) (Gerhauser and Curr, 2013).

On the other hand, some polyphenols and other antioxidant vitamins with genoprotective effects can also present carcinogenic/genotoxic effects. The idea of hormesis, a biphasic dose-response relationship in which a chemical exerts the opposite effects dependent on the dose, is very important in the field of carcinogenesis (Fukushima et al., 2005). Many antioxidants present in plants have

been shown able to prevent free radical-related diseases by counteracting cell oxidative stress. However, the *in vivo* beneficial effects are not so evident. This occurs because several plant antioxidants exhibit hormetic properties by acting as 'low-dose stressors' that may prepare cells to resist more severe stress from the activation of cell signaling pathways, but high doses are cytotoxic (Birringer, 2011). For this reason, it is important to consider the doses at which genoprotective and genotoxicity effects occur. The GEMO Assay was initially developed to test the antioxidant nature of chemical compounds that can revert oxidative damage which causes dsDNA breaks (genotoxicity).

To develop the GEMO Assay, a complementary test was performed using a well-known antioxidant molecule (vitamin C) that previous studies described as being dose-dependent antioxidant, antimutagenic and anticarcinogenic properties. The choice to use vitamin C in the ascorbic acid form in an experiment involving the GEMO Assay was based on the large body of evidence that described the ability of vitamin C to affect genetic damage from studies that investigated its action on the formation of DNA adducts, DNA strand breakage (using the Comet Assay), oxidative damage measured as levels of 8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), cytogenetic analysis of chromosomal aberrations and micronuclei, and the induction of DNA repair proteins (Sram et al., 2012).

The GEMO Assay was also validated by comparing DNA damage evaluated for alkaline the DNA Comet Assay with the same prooxidant and methodological conditions using two cell types: peripheral blood mononuclear cells, (PBMCs) and colon carcinoma cell line (HT29). The HT29 cells were isolated from a primary tumor in a 44 year old Caucasian female and formed a well-differentiated adenocarcinoma consistent with the primary grade I colony (Kawin et al., 2002). A previous study

showed the antiproliferative effects of ascorbic acid associated with the inhibition of genes necessary to cycle the progression in these cells (Belinet al., 2009).

MATERIALS AND METHODS

GEMO Assay: general conditions

The GEMO Assay (Figure 1) consists of a fast, inexpensive fluorimetric method for the screening the direct genotoxicity/antigenotoxicity effects of one determined chemical or extract without cell metabolic (mainly DNA repair and antioxidant systems) and structural (histone proteins and others) interferences. The assay includes a standardized prooxidant that is used to compare the effects of dsDNA damage on the compound-test that is evaluated with and without the addition of this prooxidant. The standard prooxidant chosen to perform the GEMO Assay was the H_2O_2 . The Fenton reaction $[(H_2O_2) + FeSO_4 \cdot 7H_2O]$ was also tested as a prooxidant condition, however the reaction presented higher instability, producing many variable results. Therefore, the dsDNA exposition to H_2O_2 at 3M concentration for 30 minutes was chosen as the better prooxidant condition. After this treatment, the PicoGreen® dye (1:200 TE) was added to the wells and the fluorescence was read after five minutes at room temperature.

The assay was performed in a black, 96-well plate and used Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent DNA from calf thymus purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA) diluted in a T.E. buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) with reagents of

the highest purity/grade purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The fluorimetric analyses are measured by Spectra Max M2/M2e Multi-mode Plate Reader, (Molecular Devices Corporation, Sunny vale, CA, USA) at an excitation of 480nm and an emission of 520nm recorded at room temperature. To improve the experiment by avoiding oxidative light effects on the reaction, the incubation periods of H₂O₂ and PicoGreen® must be conducted in darkness. Since the fluorimeter equipment is highly sensitive, and to avoid a misinterpretation of the data obtained, it is recommended that any compound or extract tested by GEMO Assay must be performed in three independent repetitions with each treatment replicated in eight wells.

Also, since the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent used in the GEMO Assay is able to quantitate lower dsDNA concentrations (~25 pg/mL) using a standard spectro fluometer, differences among fluorescence levels observed between dsDNA controls and dsDNA exposed to some genotoxic molecules can indicate dsDNA degradation. After 30 minutes of H₂O₂ incubation in the GEMO Assay, approximately $\geq 55\%$ of dsDNA is degraded. Therefore, the H₂O₂ is used as a genotoxic standard molecule in the GEMO Assay.

Furthermore, the standardization of genotoxic molecules used in the test allowed the GEMO Assay to be organized into two complementary parts. The first part evaluates if the chemical test presents genotoxic capacity. In this case, the dsDNA is exposed to different concentrations of the chemical test and the PicoGreen® fluorescence is compared with these concentrations and a non-treated dsDNA sample (negative control). The second part evaluates the genoprotective capacity of the compound-test. To analyze this potential effect, the dsDNA is exposed to a genotoxic molecule that causes a break in the dsDNA, producing a single-strand DNA (ssDNA) and/or

nucleotides that were not detected by PicoGreen® dye. This effect causes a decrease in the dsDNA fluorescence when compared with the dsDNA control group. The analysis is also performed after 30 minutes of genotoxic exposition with and without the presence of a compound-test. Since the genotoxic substance causes a decrease in dsDNA fluorescence if the compound-test is present, some genoprotective capacity will be observed at elevated fluorescence levels.

To permit data reproduction of each repetition, the results must be presented as a percentage of the negative control group considered as 100% of dsDNA concentrations measured by fluorescence. The following equation is used to determine the mean percentage of the control sample: $\text{control sample} = (\text{fluorescence of each treatment} \times 100) / \text{fluorescence of the non-treated sample}$. The results are presented as mean \pm standard error (SE) and are compared by an analysis of variance followed by a post hoc test, preferentially Tukey test.

In the first part of GEMO Assay, it is possible to observe if the compound-test presents: (1) genoprotective capacity (dsDNA fluorescence higher than 100% when compared to a control group); (2) no genomodification capacity (dsDNA fluorescence similar to an untreated control group); (3) moderate genotoxicity (dsDNA fluorescence lower than 100% yet higher or equal to 50% when compared with a control group) or (4) higher toxicity (dsDNA fluorescence lower than 50% when compared with a control group).

In the second part of the GEMO Assay, where the compound-test is added with a genotoxic substance (H_2O_2), it is possible to observe: (1) higher genoprotective capacity (dsDNA fluorescence higher than 100% when compared with a control group); (2) genoprotective capacity (dsDNA fluorescence similar to a control group); (3) partial genoprotective capacity (dsDNA fluorescence lower than 100% yet higher

or equal to 50% when compared with a control group), and (4) no genoprotective capacity (dsDNA fluorescence similar to the group treated just with H₂O₂, a positive control). In fact, only one compound-test can present all categories of the GEMO Assay dependent of its concentrations. However, the detection of this category permits a quick identification of the concentration zone that is potentially safe in terms of the effects on dsDNA and the concentration zone that presents genotoxicity indication.

Figure 1 here

To demonstrate the GEMO Assay's applicability, we treated the dsDNA with vitamin C (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), with and without the addition of H₂O₂. We choose vitamin C to perform the GEMO Assay because this antioxidant, genoprotective and antitumoral activity are well characterized (Azqueta et al., 2013). Vitamin C was also used in the validation tests using cell systems exposed in the same genotoxic conditions of GEMO Assay.

Comparison data from the GEMO Assay and the Comet Alkaline DNA Assay

Although the GEMO Assay is an easy, fast and direct test using pure dsDNA, it is necessary to validate its applicability by a comparison with the alkaline Comet DNA assay, a traditional genotoxic test. To perform this comparison test, PBMCs and HT29 colorectal cells were cultured in controlled conditions.

First, PBMCs were obtained from peripheral blood samples collected from three to four healthy adult volunteers after 12 hours of overnightfasting, via venipuncture using

top Vacutainer (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with heparin. Blood specimens (5 ml) were routinely centrifuged within 1 hour of collection for 15 minutes at 2500g using histopaque-1077® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) density gradient to obtain PBMC samples. The cells were then transferred to culture media containing 5ml RPMI 1640 with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin and streptomycin and phytohemagglutinin. The cells were cultured at an initial density of 2×10^5 cells for 72 hours at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ (Boyum 1968). The HT29 cells, a human colon adenocarcinoma cell line (ATCC), were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose (4.5 g/L, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany). Cell culture medium was also supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, USA) and cultured at 37°C in a water-saturated atmosphere containing 5% CO₂ (Yoshimoto et al. 2012).

Both cells types were also counted, centrifuged for 10 minutes at 2000g and transferred to a new culture media with and without H₂O₂(3M) and different vitamin C concentrations. The exposition was also performed for 30 minutes. Next, each cell sample treatment was centrifuged at 2000rpm for 10 minutes and cells were isolated from the supernatant culture medium. The cells were used to evaluate the genotoxic damage by the Alkaline Comet Assay; the viability was also evaluated by MTT Assay, a colorimetric assay that measures the reduction of yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) by mitochondrial succinate dehydrogenase (Mosman, 1983). The cell viability was also determined by cell-free dsDNA assay using PicoGreen® dye measured in the supernatant medium (Ha, 2011).

The Alkaline Comet Assay was performed as described by Singh et al. (1995) in accordance with the general guidelines for use of the Comet Assay (Tice et al., 2000;

Nadin et al., 2001; Hartmann et al., 2003). One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions by at least two different individuals.

Complementary cytotoxic and biochemical test

Despite the GEMO Assay being a genotoxic/genoprotective assay and its validation being dependent on a comparison of a traditional genotoxic test like the Alkaline Comet Assay, we performed a complementary investigation on PBMCs to observe if the prooxidant conditions used in the dsDNA pure molecule represent cytotoxic and oxidative stress to the cell systems.

The cytotoxicity was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolic bromide (MTT) reduction assays. The MTT reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in a 5 mg/ml phosphate buffer (PBS, 0,01M; pH 7.4), added into a 96-well plate containing the sample treatments and incubated for 4 hours. The supernatant was then removed from the wells; next, the cells were resuspended in DMSO (dimetilsulfóxido) (200 μ L). The absorbance at 560nm was read in the fluorimeter.

The cell-free dsDNA was determined by using the PicoGreen® dye in conditions similar to those used in the GEMO Assay. The genotoxicity and cytotoxicity was analyzed and compared among treatment groups of both cell lines through an analysis of the variance followed by a Tukey *post hoc* test.

Intracellular ROS production exposed to H₂O₂ plus vitamin C was detected in PBMCs using the non-fluorescent cell-permeating compound 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). DCFH-DA is hydrolysed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichloro fluorescein (DCF) by cellular oxidants. After the H₂O₂ and vitamin C exposure, the cells were treated with DCFH-DA (10 μmol/l) for 60 minutes at 37°C. The fluorescence was measured at an excitation of 488nm and an emission of 525nm. The calibration curve was performed with standard DCF (0–1 μmol) and the level of ROS production was calculated as nmol DCF formed/mg protein (Lebel and Bondy, 1992; Halliwell and Whiteman, 2004). Lipid peroxidation was quantified by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Ohkawa et al., 1979).

Statistical analysis

All analyses were carried out using the statistical package for social studies (SPSS) version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The mean values among different dsDNA treatments with and without vitamin C supplementation were compared using an analysis of variance followed by a *post hoc* Tukey test. The Pearson correlation was calculated to compare the results obtained by a GEMO Assay test in three different experiments as well as to compare the DNA damage investigated by a GEMO Assay and the Alkaline DNA Comet Assay in cells submitted to the same prooxidant conditions. All p values were two-tailed. The alpha value was considered to be statistically significant was $p = 0.05$.

Results

General conditions of GEMO Assay

The GEMO assay was developed from the conception that some genotoxic prooxidant molecule can cause dsDNA damage that can be revert by genoprotective molecules. For this reason, initially a pilot test was performed and the H_2O_2 was chosen to be a better prooxidant standard molecule to use in the GEMO Assay. In these previous tests, the Fenton reaction ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) was also tested to produce a prooxidant standard reaction (data not shown). However, the results were highly variable, most likely related to the instability of the chemical reaction. On the other hand, H_2O_2 in a high concentration presented an important effect on dsDNA degradation.

Therefore, the best prooxidant conditions obtained involved the exposition of dsDNA to H_2O_2 (3M) during 30 minutes in darkness at room temperature to avoid any influence of light on the chemical reaction. As seen in Figure 2, the control group presented 100% of fluorescence. This value decreased to 50% of fluorescence when H_2O_2 was present, indicating dsDNA degradation. Analysis of potential interference of the TE buffer and H_2O_2 on PicoGreen® dye fluorescence was also tested; the results did not show any significant influence of T.E. and H_2O_2 on the fluorescence excitation at 480nm and emission at 520nm (Figure 2).

Figure 2 here

GEMO Assay evaluation of vitamin C genotoxic and genoprotective capacity

After the standardization of GEMO conditions, a test using vitamin C as the compound-test was performed. The results obtained in the GEMO Assay are presented in Table 2 and Figure 3. As expected, the assay showed no genotoxic effect from different vitamin C concentrations on dsDNA since the fluorescence was similar to that which was observed in the untreated dsDNA sample (Figure 3A). Conversely, vitamin C in lower doses tested (0.1 to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) protected the dsDNA from genotoxic effects caused by H_2O_2 . Higher vitamin C concentrations did not reverse the DNA damage caused by exposition to H_2O_2 (Figure 3B). Table 1 also shows the coefficient percentage of variation (CV) of all treatments calculated by $[(\text{standard deviation}/\text{mean}) \times 100]$. The H_2O_2 alone and with several vitamin C concentrations showed higher CV (>10< 18%) than dsDNA control (<10%) which was only treated with different vitamin C concentrations. These differences between CV indicate some level of instability in the H_2O_2 reaction with dsDNA as well as vitamin C.

Figure 3 here

Table 1 here

The reproducibility of the GEMO Assay was evaluated by comparing data assessed by three independent experiments that followed similar laboratorial conditions. The dsDNA degradation caused by H_2O_2 showed a good reproducibility patterns in the independent three experiments since the Pearson correlation was high and significant ($p < 0.0001$) among the three experiments: $r^2_{\text{first x second}} = 0.92$; $r^2_{\text{first x third}} = 0.84$; $r^2_{\text{second x third}} = 0.916$.

Comparison between the GEMO Assay and the Alkaline DNA Comet Assay

The Comet Assay has been developed as a means of detecting cellular DNA damage; it is generally used in a variety of fields, such as biological monitoring and genetic toxicology. The distance migrated by cellular DNA during electrophoresis directly reflects the extent of DNA damage present (McKelvey-Martin et al., 1993). Therefore, this method was used to measure DNA damage in lymphocytes as well as HT29 colon cancer cells exposed to the same methodological conditions used in the GEMO Assay.

The index damage results for both cell lines are presented in Figure 4. The PBMCs exposed to H₂O₂ showed higher DNA damage when compared with the control group. The vitamin C alone presented similar index damage to the control group as well as protected against H₂O₂ damage, although this protection was partial when compared with an untreated control group ($p < 0.0001$). A Pearson correlation was performed between the GEMO Assay considering the dsDNA percentage of fluorescence control and the Comet alkaline results considering the index damage. The results showed a high negative correlation between both tests $r^2 = -0.828$ ($p < 0.0001$). Higher dsDNA fluorescence measured by GEMO Assay is associated with lower index damage measured by an Alkaline DNA Assay (Figure 4A).

An additional protocol was performed using the HT29 colorectal cell line as experimental model to evaluate if the results obtained in GEMO assay could be consistent to cancer cells. The results presented in the Figure 4B showed that H₂O₂ exposition on the HT29 cancer line did not present a genotoxic effect since the index

damage was similar to observed in untreated control cells. On the other hand, vitamin C at 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ increased the index damage of HT29 cells. The concomitant exposition with H_2O_2 and vitamin C decreased the index damage to values similar observed in control and H_2O_2 groups. Contrary to the results found in PBMCs, no significant correlation was found between GEMO Assays and the Alkaline DNA Assay performed in HT29 cells ($r^2 = 0.105$, $p = 0.624$).

Figure 4 here

Complementary tests were performed to confirm the prooxidant and toxic conditions of the experiment (Table 2). The cell viability was significantly affected by a high H_2O_2 concentration when compared with the control group. The vitamin C treatment did not affect the PBMCs viability, and when H_2O_2 was present, the cytotoxicity partially reverted. As expected, the treatment with H_2O_2 generated higher levels of ROS when compared with the control group. The ROS levels were similar in cells exposed to vitamin C whereas cells exposed to vitamin C plus H_2O_2 presented intermediary ROS levels when compared with the control group and H_2O_2 cell treatments. The lipoperoxidation was also significantly affected by vitamin C with and without H_2O_2 exposition. The vitamin C concentrations caused an increase in the TBARS levels without H_2O_2 exposition. However, the cells exposed to vitamin C plus H_2O_2 presented partial reversion of lipoperoxidation when compared to the cells treated just with H_2O_2 .

The whole of these results confirms the toxic conditions created by the conditions used in the GEMO Assay suggesting that this test conveys some real conditions found when the biological systems are exposed to prooxidant and antioxidant molecules that affect the DNA damage.

Discussion

The present study described a fast non-cell method to evaluate the effects of chemicals on DNA molecule fragmentation using a high specific dsDNA dye (Picogreen®). The GEMO assay can be useful to early screening of chemicals or pollutants agents since, complementary to additional and traditional tests performed in cell models.

Apparently, a cell culture approach is the best way to evaluate the genotoxicity or genoprotective effects of chemical compounds. In fact, despite some disadvantages at the level of genetic stability, cell lines are often preferred by some laboratories based on ease of handling frozen stocks of cells, lack of variation that can occur in human lymphocyte donors and the existence of large historical databases. However, the design of the protocol is crucial in the generation of accurate results and assessment of the genotoxic potential of the test substance. Therefore, the choice of the cellular system, treatment duration, the use of a cytokinesis blocker, the class of the test compound or the addition of metabolic components may significantly influence the test outcome (Kirsch-Volders et al., 2011).

In addition, the genotoxicity screening of chemical compounds using biological models always involves some type of variation related to genetic and experimental conditions where *in vitro* and *in vivo* assays are performed. Genetic variations related to cellular and body metabolism present in tissues and cells may produce under or overestimated toxicological or pharmacological results. For example, several studies have suggested that genetic variations present in the human superoxide dismutase manganese dependent gene (Ala16Val-SOD2) are associated with the susceptibility

of some neoplasia like prostate, breast and lung cancers (Taufer et al., 2005; Zejnilovic et al., 2009; Bica et al., 2010; Mao et al., 2010). However, this association is also influenced by environmental factors such as diet, smoking habits and occupational exposition (Ambrosone et al., 1999; Cai et al., 2004; Tamimi et al., 2004; Hung et al., 2004; Fong et al., 2007; Choi et al., 2008; Iguchi et al., 2009; Chen et al., 2012). Based on these results, in vitro investigations considering the Ala16Val-SOD2 polymorphism have been performed showing the effect of the toxicological response results (Martin et al., 2008; Montagner et al., 2010; Costa et al., 2012). As in general toxicology in vitro tests, using a small number of samples from donors of this genetic variation may be an important intervening factor in the results obtained.

Another concern involving initial genotoxicity screening of chemical compounds, potentially toxic or with pharmacological interest, is the time and cost of the investigations involving DNA damage. The vast numbers of biologically uncharacterized environmental, industrial, and novel pharmaceutical chemicals do not allow the testing of each for genotoxicity in the standard resource-intensive battery. The high economic costs of these tests sometimes limit the analysis to a few compounds in the early genotoxicity testing (Mahadevan et al., 2011).

Therefore, the GEMO assay could to obtain some primary data for the potential genotoxicity or genoprotective effect of some chemicals on agents in the pure dsDNA molecule. In these terms, is relevant to discuss some questions related to GEMO assay approach, as the use of H₂O₂ as prooxidant molecule.

The H₂O₂ is a molecule involved in several signaling cell pathways. However, when found (or used) in higher levels produced by different insults such as UV, X and γ radiation, pollutants, poisons, or endogenous disequilibria can produce different

types of DNA damage (Caputo et al., 2012). There is consistent evidence that H_2O_2 causes genomic damage by indirect action such as higher order chromatin degradation, enzymatic excision of chromatin loops and their oligomers at matrix-attachment regions. However, the hydroxyl radical, generated through the Fenton or Haber-Weiss reaction, is more reactive than either superoxide or H_2O_2 and causes direct damage to DNA and other macromolecules resulting in DNA strand breaks and mutations (An and Kang, 2013; Yin, 2013).

When we performed preliminary tests to develop the GEMO Assay, we analyzed the possibility of using the Fenton reaction to generate dsDNA damage. However, a greater instability occurred in the reaction between H_2O_2 and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ producing highly variable results with lower precision and reproducibility (Lange et al., 2006).

Despite the direct action of H_2O_2 on DNA damage being seen as controversial, some studies performed by Driessens et al., (2009) investigated whether the high levels of H_2O_2 produced in the thyroid to oxidize iodide could induce genotoxicity and if they showed DNA damage. It would be difficult to compare these data with our results. The majority of our investigations used biological systems to test the genotoxic compounds; these systems present several structural and metabolic pathways and the GEMO protocol indicates H_2O_2 damage action to dsDNA. Perhaps, in the GEMO Assay, the H_2O_2 effect on dsDNA damage is associated with a higher concentration of this molecule (3M).

It is important to do some considerations about the GEMO assay and the traditional genotoxic assay broadly as DNA Comet assay to evaluate DNA damages. Due to the environmental and health importance of detecting genotoxic effects of chemical compounds, different *in vivo* and *in vitro* assays have been developed including, the

DNA Comet Assay developed by Ostling and Johanson (1984) and further modified by Singh et al. (1988) by the inclusion of unwinding DNA under alkaline conditions ($\text{pH} > 13$). Several versions of the Comet Assay are currently in use, but there are some general steps which apply to all versions. After obtaining a suspension of the cells, the basic steps in the assay include the preparation of microscope slides layered with cells embedded in an agarose gel, lysis of the cells to liberate the DNA, DNA unwinding, electrophoresis, neutralization of the alkaline DNA staining, and scoring. Unwinding of the DNA and electrophoresis at a neutral pH predominantly facilitates the detection of double-strand breaks and cross-links; unwinding and electrophoresis at $\text{pH} 12.1\text{--}12.4$ facilitates the detection of single and double-strand breaks, incomplete excision repair sites and cross-links (Miyamae et al., 1988).

Although the Comet Assay being a broad method of evaluating the genotoxic/genoprotective effects of determined compounds, the existence of different versions of this assay involves several steps that use up a relatively large amount of time from the material preparation to DNA damage analysis. Despite the fact that the Comet Assay is a method with great potential to evaluate the DNA damage status from *in vitro* and *in vivo* protocols, its use for the initial screening of genoprotective/genotoxic effects of environmental or pharmacological compounds is not realistic.

Due de large use of DNA assay to evaluate DNA damage in the study the results obtained from GEMO assay were compared to results Comet assay performed in human health cells (PBMCs) as well as HT29 cancer line cell. The results showed a high negative correlation between GEMO assay and DNA Comet assay using health PBMCs cells as experimental model suggesting that GEMO assay can be usefully to screening of genotoxicity or genoprotective effect of some chemical compounds or

pollutant agent. On the other hand, no significant correlation was found between DNA Comet and GEMO assay performed in cancer cells. The differences between the results obtained from PBMCs and HT29 probably reflect the differences between the biology of normal and cancer cells and antitumoral vitamin C activity (Verrax and Calderon, 2009). For example, HT29 cells were isolated from a primary tumor in a 44 year old Caucasian female. Forms a well-differentiated adenocarcinoma consistent with colony primary, grade I. HT-29 is hypertriploid (3n) and has accumulated numerous chromosomal structural aberrations. Although numerous chromosomal aberrations are present in HT-29, the cell line appears to have retained a high level of genomic stability during passage in culture since undergoing transformation (Kawai et al., 2002). Somehow the specifics of HT29 karyotype could be exerting some influence in the no correlation results between GEMO and DNA Comet assay described here.

From these results, the GEMO Assay could be a complementary test to the screening of new chemicals or unknown plant extracts to detect the dose-range that presents genoprotective and/or genotoxicity capacity using a dsDNA pure molecule. From the results obtained using this fast and inexpensive assay, it is possible to identify the range of concentrations that can potentially be used to realize additional tests using biological systems (cells and animals). The GEMO Assay does present limitations intrinsic to non-cell *in vitro* tests such as: (1) the effect of cellular protective mechanisms against prooxidants with potential carcinogenic properties is not evaluated; (2) the interactions between the prooxidant and other molecules present in the extra and intra-cellular environment that can attenuate or increase the mutagenic effect is also not evaluated, and (3) the test is limited to molecules that have some effect on H₂O₂ that does not represent a “universal” prooxidant. However,

the use of other prooxidant compounds or with other chemical properties that cause mutagenesis can be used as a substitute for H₂O₂ used to develop the GEMO Assay.

CONCLUSIONS

Due to the necessity of the identification of chemicals with genoprotective and genotoxic effects and that the contemporary Eukaryotic Assay involves more complex and expensive tests, the fluorimetric GEMO Assay was developed. This test permits a rapid assessment of a CT effect on a dsDNA molecule without interfering variables to estimate if this compound does or does not have Genomodifier capacity (genotoxic and genoprotective) and the range of concentrations that these properties occurs.

Acknowledgements

We are grateful to the Biogenomic Lab research team for helping us with data collection. The study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

References

- Ahn, S.J., Costa, J., Emanuel, J.R., 1996. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic. Acids. Res.* 24, 2623-1625.
- Alavanja, M.C., Bonner, M.R., 2012. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *J. Toxicol. Environ. Health B.Crit. Rev.* 15, 238-263.
- Ambrosone, C.B., Freudenheim, J.L., Thompson, P.A., Bowman, E., Vena, J.E., Marshall, J.R., Graham, S., Laughlin, R., Nemoto, T., Shields, P.G., 1999. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res.* 59, 602-606.
- An, S.H., Kang, J.H., 2013. Oxidative damage of DNA induced by the reaction of methylglyoxal with lysine in the presence of ferritin. *BMB Rep.* 46, 225-229.
- Azqueta, A., Costa, S., Lorenzo, Y., Bastani, N.E., Collins, A.R., 2013. Vitamin C in cultured human (HeLa) cells: lack of effect on DNA protection and repair. *Nutrients.* 5, 1200-1217.
- Belin, S., Kaya, F., Duisit, G., Giacometti, S., Ciccolini, J., Fontés, M., 2009. Antiproliferative effect of ascorbic acid is associated with the inhibition of genes necessary to cell cycle progression. *PLoSOne.* 4, 4409.
- Bica, C.G., da Silva, L.L., Toscani, N.V., Zettler, C.G., Gottlieb, M.G., Alexandre, C.O., Graudenz, M.S., Mânica da Cruz, I.B., 2010. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 196,153-158.
- Birringer, M., 2011. Hormetics: dietary triggers of an adaptive stress response. *Pharm. Res.* 28, 2680-2694.
- Bøyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J.Clin. Lab. Invest.Suppl.* 97, 77-89.
- Cai, Q., Shu, X.O., Jin, F., Dai, Q., Wen, W., Cheng, J.R., Gao, Y.T., Zheng, W. 2003. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 853-859.

Caputo, F., Vegliante, R., Ghibelli, L., 2012. Redox modulation of the DNA damage response. *Biochem. Pharmacol.* 84,1292-306.

Charoensin, S., Taya, S., Wongpornchai, S., Wongpoomchai, R., 2012. Assessment of genotoxicity and antigenotoxicity of an aqueous extract of *Cleistocalyx nervosum* var. *panialain* *in vitro* and *in vivo* models. *Interdiscip. Toxicol.* 5, 201-206.

Chen, S.C., Chen, C.C., Kuo, C.Y., Huang, C.H., Lin, C.H., Lu, Z.Y., Chen, Y.Y., Lee, H.S., Wong, R.H., 2012. Elevated risk of hypertension induced by arsenic exposure in Taiwanese rural residents: possible effects of manganese superoxide dismutase (MnSOD) and 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) genes. *Arch. Toxicol.* 86, 869-878.

Choi, J.Y., Neuhouser, M.L., Barnett, M., Hudson, M., Kristal, A.R., Thornquist, M., King, I.B., Goodman, G.E., Ambrosone, C.B., 2007. Polymorphisms in oxidative stress-related genes are not associated with prostate cancer risk in heavy smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 1115-1120.

Costa, F., Dornelles, E., Mânica-Cattani, M.F., Algarve, T.D., Souza Filho, O.C., Sagrillo, M.R., Garcia, L.F., Cruz, I.B., 2012. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the *in-vitro* effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reprod. Biomed. Online.* 24, 474-481.

Crespo-López, M.E., Macêdo, G.L., Pereira, S.I., Arrifano, G.P., Picanço-Diniz, D.L., do Nascimento, J.L., Herculano, A.M., 2009. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacol. Res.* 60, 212-220.

dos Santos Montagner, G. F., Sagrillo, M., Machado, M.M., Almeida, R.C., Mostardeiro, C.P., Duarte, M.M., da Cruz, I.B.M., 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol. In Vitro.* 24, 1410-1416.

Driessens, N., Versteyhe, S., Ghaddhab, C., Burniat, A., De Deken, X., Van Sande, J., Dumont, J.E., Miot, F., Corvilain, B., 2009. Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocr. Relat. Cancer.* 16, 845-856.

Flora, S.J., 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 257-281.

Fong, C.S., Wu, R.M., Shieh, J.C., Chao, Y.T., Fu, Y.P., Kuao, C.L., Cheng, C.W., 2007. Pesticide exposure on south western Taiwanese with MnSOD and NQO1 polymorphisms is associated with increased risk of Parkinson's disease. *Clin. Chim. Acta.* 378, 136-141.

Fukushima, S., Kinoshita, A., Puatanachokchai, R., Kushida, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., 2005. Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis.* 26, 1835-1845.

Gerhauser, C., 2013. Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges. *Top Curr. Chem.* 329, 73-132.

Gold, L.S., Manley, N.B., Slone, T.H., Rohrbach, L., Garfinkel, G.B., 2005. Supplement to the Carcinogenic Potency Database (CPDB): results of animal bioassays published in the general literature through 1997 and by the National Toxicology Program in 1997-1998. *Toxicol. Sci.* 85, 747-808.

Ha, T.T., Huy, N.T., Murao, L.A., Lan, N.T., Thuy, T.T., Tuan, H.M., Nga, C.T., Tuong, V.V., Dat, T.V., Kikuchi, M., Yasunami, M., Morita, K., Huong, V.T., Hirayama, K., 2011. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PLoS One.* 6, 25969.

Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231-55.

Hartmann, A., Plappert, U., Poetter, F., Suter, W., 2003. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat. Res.* 536, 27-38.

Hung, R.J., Boffetta, P., Brennan, P., Malaveille, C., Gelatti, U., Placidi, D, Carta, A., Hautefeuille, A., Porru, S., 2004. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis.* 25, 973-978.

Iguchi, T., Sugita, S., Wang, C.Y., Newman, N.B., Nakatani, T., Haas, G.P., 2009. MnSOD genotype and prostate cancer risk as a function of NAT genotype and smoking status. *In Vivo.* 23, 7-12.

Kirsch-Volders, M., Decordier, I., Elhajouji, A., Plas, G., Aardema, M.J., Fenech, M., 2011. *In vitro* genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*. 26, 177-184.

Lange, L.C., Alves, J.F., Amaral, M.C.S., Júnior, W.R.M., 2006. Sanitary land fill leachate treatment by Fenton oxidation. *Eng. Sanit. Ambient.* 11, 175-183.

LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227-31.

Levy, M.S., Lotfian, P., O'Kennedy, R., Lo-Yim, M.Y., Shamlou, P.A., 2000. Quantitation of supercoiled circular content in plasmid DNA solutions using a fluorescence-based method. *Nucleic. Acids. Res.* 28, E57.

Mahadevan, B., Snyder, R.D., Waters, M.D., Benz, R.D., Kemper, R.A., Tice, R.R., Richard, A.M., 2011. Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 339-54.

Mao, C., Qiu, L.X., Zhan, P., Xue, K., Ding, H., Du, F.B., Li, J., Chen, Q., 2010. MnSOD Val16Ala polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis involving 8,962 subjects. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 975-9.

Martin, R.C., Barker, D.F., Doll, M.A., Pine, S.R., Mechanic, L., Bowman, E.D., Harris, C.C., Hein, D.W., 2008. Manganese superoxide dismutase gene coding region polymorphisms lack clinical incidence in general population. *DNA Cell Biol.* 27, 321-323.

McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P., Collins, A., 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.* 288, 47-63.

Miyamae, Y., Yamamoto, M., Sasaki, Y.F., Kobayashi, H., Igarashi-Soga, M., Shimoi, K., Hayashi, M., 1998. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutat. Res.* 418, 131-140.

Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63.

Nadin, S.B., Vargas-Roig, L.M., Ciocca, D.R., 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1183-1186.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-8.

Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-98.

Sharma, O.P., Tej, K., Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry.* 113, 1202-1205.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.

Sram, R.J., Binkova, B., Rossner, P. Jr., 2012. Vitamin C for DNA damage prevention. *Mutat. Res.* 733, 39-49.

Tamimi, R.M., Hankinson, S.E., Spiegelman, D., Colditz, G.A., Hunter, D.J., 2004. Manganese superoxide dismutase polymorphism, plasma antioxidants, cigarette smoking, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 989-96.

Taufer, M., Peres, A., de Andrade, V.M., de Oliveira, G., Sá, G., do Canto, M.E., dos Santos, A.R., Bauer, M.E., da Cruz, I.B., 2005. Is the Val16Ala Manganese Superoxide Dismutase Polymorphism Associated With the Aging Process? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 60, 432-438.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.

Verrax, J., Calderon, P.B., 2009. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 32-40.

Xie, H., Mason, M.M., Wise, J.P. Sr., 2011. Genotoxicity of metal nanoparticles. *Rev. Environ. Health.* 26, 251-68.

Yin, R., Zhang, D., Song, Y., Zhu, B.Z., Wang, H., 2013. Potent DNA damage by polyhalogenated quinones and H₂O₂ via a metal-independent and Intercalation-enhanced oxidation mechanism. *Sci. Rep.* 3, 1269.

Yoshimoto, A.N., Bernardazzi, C., Carneiro, A.J., Elia, C.C., Martinusso, C.A., Ventura, G.M., Castelo-Branco, M.T., de Souza, H.S., 2012. Hedgehog pathway signaling regulates human colon carcinoma HT-29 epithelial cell line apoptosis and cytokine secretion. PLoSOne. 7, e45332.

Zejnilovic, J., Akev, N., Yilmaz, H., Isbir, T., 2009. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. Cancer Genet. Cytogenet. 189, 1-4.

Table 1 Genomodification effect of some compound-tests evaluated by GEMO Assay to estimate its genotoxicity or genoprotective level

Evaluation	Level			
	4	3	2	1
Genotoxic capacity¹	>100	100 (-Control)	<100_{≥50}	<50 (+ Control)
	Indication of genoprotective capacity	No effect	Moderate genotoxicity	Higher genotoxicity
CT₁				
CT₂				
CT₃				
CT₄				
CT₅				
Genoprotective capacity²	4	3	2	1
	Higher genoprotective capacity	Genoprotective capacity	Moderate genoprotective capacity	No genoprotective effect
CT_{1h}				
CT_{2h}				
CT_{3h}				
CT_{4h}				
CT_{5h}				

¹The absorbance of negative control is considered 100% and the percentage to each concentration of the compound-test (CT) is calculated (absorbance of CT x 100)/absorbance of negative control) and compared by analysis of variance followed by a Tukey *post hoc* test. From the statistical results, it is possible to categorize each concentration into four levels to estimate the genotoxic capacity: 4= indication of genoprotective capacity (green, mean±SD > 100%); 3= no effect on dsDNA molecule (yellow, mean± SD= 100%); 2= moderate genotoxicity (orange, mean± SD= < 100≥ 50 %) and 1= higher genotoxic capacity (red, mean± SD < 50%) ² = genoprotective capacity is performed with an analysis of the compound test plus H₂O₂, 3M. Therefore, the absorbance of positive control (H₂O₂, 3M) must be included in statistical analysis. The positive control (H₂O₂, 3M) must present values < 50%. From the statistical results, it is also possible to categorize each concentration into four levels to estimate the genoprotective capacity: 4= higher genoprotective capacity (green, mean± SD=> 100%); 3 = genoprotective capacity (yellow, mean± SD= 100%), 2 = moderate genoprotective capacity (orange, <100>50%) and, 1= no genoprotective effect (red, > 50%).

Table 2 Complementary tests of prooxidant conditions of the GEMO Assay test using PBMCs samples

Treatments	MTT	ROS	TBARS
	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE
Control	99.9 ± 1.1 ^a	102.9 ± 1.3 ^a	100.2 ± 0.4 ^a
H ₂ O ₂	4.2 ± 0.6 ^b	371,9 ± 2.5 ^b	345.2 ± 1.2 ^b
0.1	88.2 ± 2.3 ^a	97.1 ± 1.4 ^a	121.7 ± 1.1 ^c
1	86.3 ± 1.3 ^a	90.4 ± 1.5 ^c	118.1 ± 1.6 ^c
10	86.9 ± 1.5 ^a	108 ± 2.2 ^a	119.3 ± 1.9 ^c
0.1 plus H ₂ O ₂	13.7 ± 1.9 ^c	144.6 ± 1.8 ^d	178.4 ± 1.8 ^d
1 plus H ₂ O ₂	15.5 ± 1.7 ^c	160.7 ± 2.3 ^e	190.1 ± 2.1 ^e
10 plus H ₂ O ₂	7.8 ± 0.8 ^b	171.6 ± 1.8 ^e	197.3± 2.0 ^e

SE= standard error. The results are expressed as % of control dsDNA group. Different letters indicating significant statistic differences among the treatments compared by analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test at p=0.05 significance.

Legend	Calf Thymus DNA 1µg/ml	T.E. Buffer 1x	H ₂ O ₂ 3M	Compound test
● Negative Control	20 µL	180 µL	-----	-----
● Positive Control genotoxic	20 µL	130 µL	50 µL	-----
Several concentrations of compost test ● ● ● ● ●	20 µL	130 µL	-----	50 µL
Several concentrations of compost test: + H ₂ O ₂ 3M ● ● ● ● ●	20 µL	80 µL	50 µL	50 µL

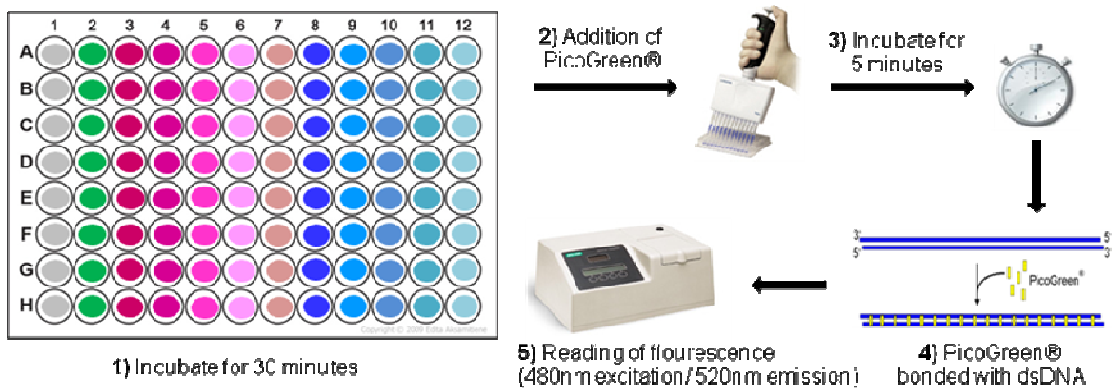


Figure 1. The GEMO assay protocol.

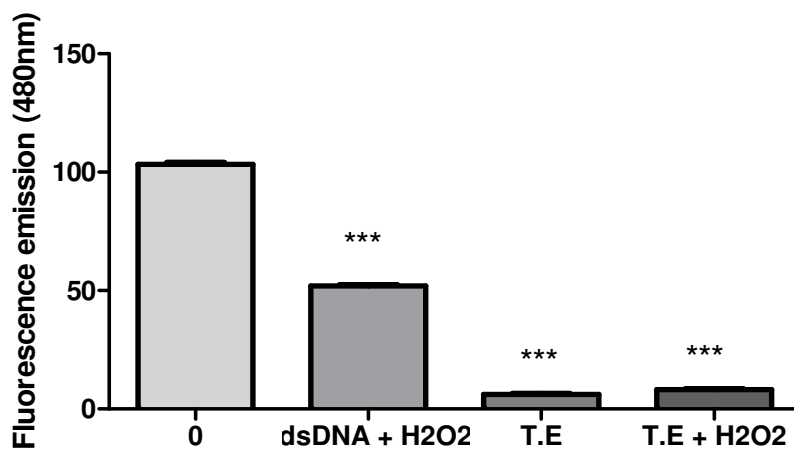


Figure 2. The fluorescence decreased when H₂O₂ was present, indicating dsDNA degradation. Analysis of potential interference of the TE buffer and H₂O₂ on PicoGreen® dye fluorescence did not show any significant influence of T.E. and H₂O₂ on the fluorescence.

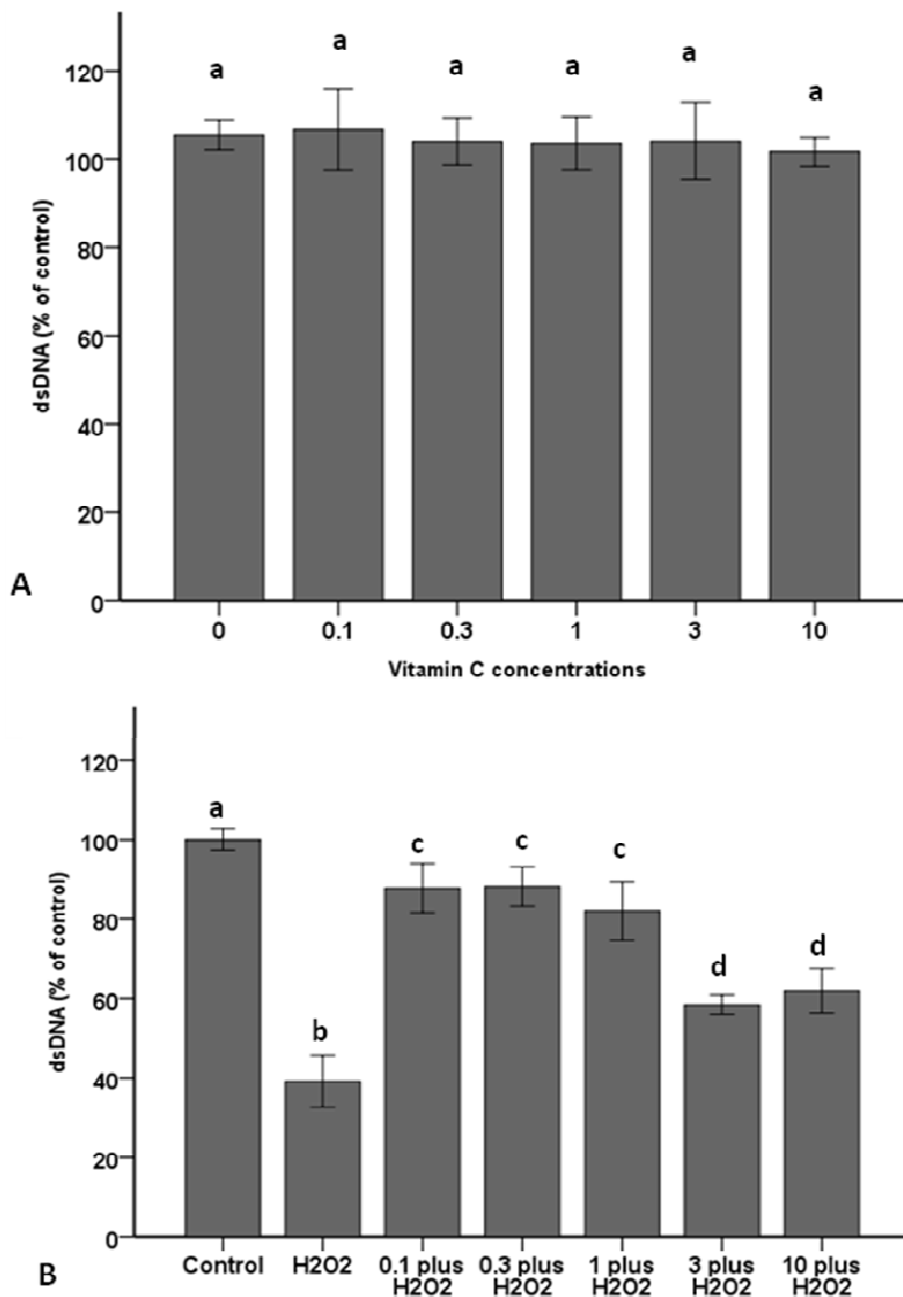


Figure 3. A) The assay showed no genotoxic effect from different vitamin C concentrations on dsDNA since the fluorescence was similar to that which was observed in the untreated dsDNA sample. B) Vitamin C in lower doses tested (0.1 to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) protected the dsDNA from genotoxic effects caused by H_2O_2 . Higher vitamin C concentrations did not reverse the DNA damage caused by exposition to H_2O_2 .

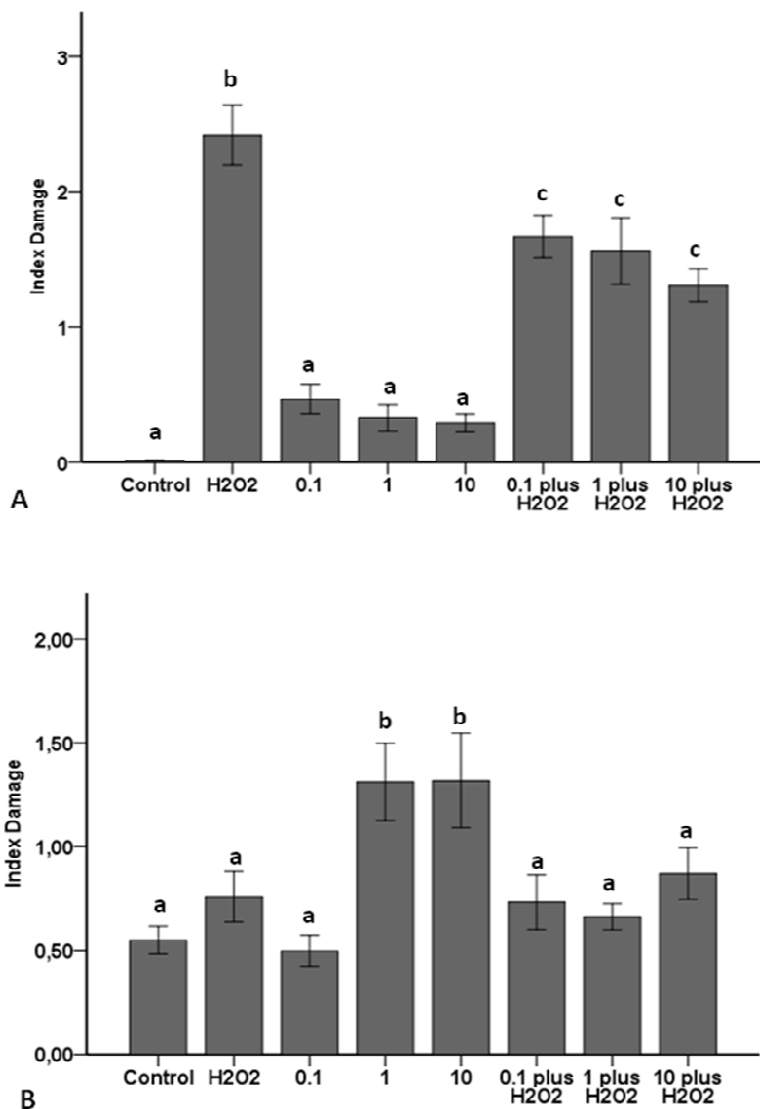


Figura 4. A) The PBMCs exposed to H₂O₂ showed higher DNA damage when compared with the control group. The vitamin C alone presented similar index damage to the control group as well as protected against H₂O₂ damage, although this protection was partial when compared with an untreated control group ($p < 0.0001$). B) The results showed that H₂O₂ exposition on the HT29 cancer line did not present a genotoxic effect since the index damage was similar to observed in untreated control cells. The vitamin C at 1 and 10 µg/mL increased the index damage of HT29 cells. The concomitant exposition with H₂O₂ and vitamin C decreased the index damage to values similar observed in control and H₂O₂ groups.

4. DISCUSSÃO

Diante da necessidade de se obter um detalhamento inicial das propriedades genomodificadoras de substâncias químicas em pesquisas toxicológicas, o Teste GEMO foi desenvolvido para auxiliar a detecção de compostos mutagênicos e genoprotetores. Esse método não foi concebido para substituir nenhum ensaio existente e sim para que em conjunto com outros testes possa facilitar a identificação de substâncias que interagem com a molécula pura de DNA, sem a interferência de fatores biológicos, como maquinaria de reparo do DNA e sistemas antioxidantes.

O Teste GEMO pode ser considerado um ensaio rápido e simples pois utiliza o reagente PicoGreen® para a quantificação do dsDNA, que emite a fluorescência em apenas cinco minutos de incubação com o DNA. Para facilitar a análise dos dados e para identificar capacidade antioxidante e de reversão do composto investigado, o Teste GEMO inclui um pró-oxidante que foi estipulado como uma referência de composto genotóxico, o H₂O₂. Esse pró-oxidante foi escolhido pelo fato de apresentar uma reação mais estável e com valores mais precisos, adicionalmente, pela razão desse reagente ser de fácil acesso, o que torna a técnica relativamente simples e barata.

O uso de um pró-oxidante de referência possibilita ao Teste GEMO ter a capacidade de detectar substâncias tanto com potencial genoprotetor quanto genotóxica, pelo fato da substância investigada poder ser analisada isoladamente ou com a presença do agente agressor do DNA. Por isso, o ensaio é constituído por duas partes, a primeira permite que o teste classifique a substância testada, por meio da comparação da fluorescência em percentual ao controle (apenas com o dsDNA), em 4 níveis de genotoxicidade: (1) capacidade genoprotetora (fluorescência do dsDNA maior que 100 % quando comparada com o grupo controle); (2) sem capacidade genomodificadora (fluorescência do dsDNA similar ao grupo controle); (3) genotoxicidade moderada (fluorescência do dsDNA menor que 100% e maior ou igual a 50% quando comparado ao grupo controle); ou (4) alta genotoxicidade (fluorescência do dsDNA menor que 50% quando comparada com o grupo controle).

Na segunda parte do Teste Gemo, onde o composto é adicionado junto com o H_2O_2 , é possível observar: (1) alta capacidade de genoproteção (fluorescência do dsDNA é maior que 100 % quando comparado ao grupo controle); (2) presença de capacidade de genoproteção (fluorescência do dsDNA é similar ao grupo controle); (3) capacidade de genoproteção parcial (fluorescência do dsDNA menor que 100% e maior ou igual a 50% quando comparada com o grupo controle) e (4): sem capacidade de genoproteção (fluorescência do dsDNA similar ao grupo tratado apenas com o H_2O_2). Dependendo da concentração o mesmo composto teste pode se encaixar em mais de uma categoria, pois pode ocorrer o Efeito Hormese. Essa capacidade de encontrar a concentração específica da substância investigada corrobora para tornar o Teste GEMO uma ferramenta extremamente útil para pesquisas toxicológicas.

Para o desenvolvimento do Teste GEMO, um complementar teste foi implementado usando um antioxidante bem conhecido, a vitamina C. A escolha dessa molécula na forma de ácido ascórbico para o desenvolvimento do Teste GEMO foi baseada em evidências da capacidade dessa vitamina causar danos ao DNA, através da formação de adutos de DNA, quebras em nível de fita dupla e simples (analisado pelo Teste do Cometa), danos oxidativos mensurado em nível da 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), análise citogenética de aberrações cromossômicas e micronúcleos (SRAM et al., 2012). A vitamina C também foi utilizada para a validação do Teste GEMO utilizando sistemas celulares com as mesmas condições usadas no teste desenvolvido.

O Teste GEMO foi validado através da comparação da detecção do dano no DNA pelo Teste do Cometa Alcalino (SINGH et al., 1988), da viabilidade celular pelo Teste do MTT (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio) (MOSMAN et al., 1983), da taxa de produção de radicais livres pelo Teste da DCFH-DA (Diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína) (LEBEL et al., 1992) e da peroxidação lipídica pelo Teste do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (OHKAWA et al., 1979), onde foi usada a mesma metodologia que o Teste GEMO, ou seja, as mesmas concentrações e tipos de antioxidante e pró-oxidante, vitamina C e H_2O_2 , respectivamente. Foram testadas duas linhagens celulares: Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) e células de adenocarcinoma de colorretal (HT29).

As células HT29 foram escolhidas para a validação do teste, pelo fato de já existirem trabalhos mostrando que o efeito antiproliferativo da vitamina C está

relacionado com a inibição dos genes necessários para o ciclo celular responsáveis pela progressão dessas células (BELIN et al., 2009). Em contra partida, uma análise utilizando células fisiologicamente normais, como os PBMCs, é necessária para que seja realizada uma comparação com os resultados obtidos a partir das células cancerígenas, que apresentam alterações morfofuncionais, para que assim o Teste GEMO possa ser invariavelmente validado.

Os resultados gerados no Teste do Cometa Alcalino obtidos das células HT29 e dos PBMCs não foram os mesmos. Enquanto o Teste do Cometa Alcalino usando PBMCs mostrou uma alta correlação com os resultados encontrados no Teste GEMO, os resultados usando HT29 não tiveram uma significativa correlação. Isso se explica provavelmente pelo fato dessas células apresentarem sistemas biológicos com extremas diferenças e também pela atividade antitumoral da vitamina C que agiu lesionando as células neoplásicas.

Complementariamente, os testes bioquímicos de parâmetros oxidativos, TBRAS, DCFH-DA e MTT, foram utilizados para confirmar a capacidade pró-oxidante do H_2O_2 e as condições toxicológicas do experimento. As taxas da viabilidade celular dos PBMCs diminuíram e aumentaram com o uso do H_2O_2 e da vitamina C, respectivamente. O mesmo foi encontrado para a produção de radicais livres e peroxidação lipídica. Diante disso, há uma grande correlação desses resultados com os encontrados no Teste GEMO, sugerindo que esse teste expressa condições factíveis quando sistemas biológicos são expostos a moléculas pró-oxidantes e antioxidantes, que por sua vez, podem gerar lesões à molécula de DNA.

Portanto, o Teste GEMO poderia ser um teste complementar para a investigação das propriedades mutagênicas de novos químicos ou desconhecidos extratos de plantas e para detectar em que concentrações essas substâncias apresentam capacidade genotóxica e genoprotetora usando a molécula de sdDNA pura. A partir desses resultados usando esse rápido e sensível teste, é possível identificar várias concentrações que podem ser potencialmente usadas em outros testes que utilizam sistemas biológicos (células e animais) para corroborar na identificação de novas substâncias.

Como qualquer ensaio, o Teste GEMO apresenta algumas limitações intrínsecas de métodos *in vitro* que não utilizam sistemas biológicos, como: (1) os efeitos de mecanismos de proteção e reparo contra a ação dos pró-oxidantes, não são avaliados; (2) as interações entre o pró-oxidantes e outras moléculas presentes

no meio extra e intracelular, que pode atenuar ou aumentar os efeitos mutagênicos, também não são detectados e (3) o teste é limitado a moléculas que possuem algum efeito sobre o H_2O_2 que não é considerado um pró-oxidante universal. Entretanto, a utilização de outros pró-oxidantes ou com outras propriedades químicas que gerem mutações, podem ser usados para substituir o H_2O_2 usado para o desenvolvimento desse teste.

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, podem ser feitas as seguintes conclusões sobre o Teste GEMO:

- Foi desenvolvido para detectar substâncias com capacidade genomodificadora (genotóxica/genoprotetora);
- Não utiliza sistemas biológicos e sim apenas a molécula pura de dsDNA, o que evita várias interferências;
- Emprega um pró-oxidante de referência, que permite a análise comparativa dos dados obtidos;
- Os resultados são gerados de forma quantitativa, sem a interferência da subjetividade do analisador;
- É um teste muito rápido, fácil, extremamente sensível e relativamente barato;
- É capaz de classificar as substâncias testadas em diferentes níveis de genotoxicidade;
- Permite a identificação da capacidade genoprotetora e de reversão de danos ao dsDNA de uma determinada molécula, classificando-a em diferentes níveis de genoproteção;
- Admite que a mesma substância seja testada em várias concentrações, o que possibilita identificar substâncias que apresentam tanto capacidade genotóxica quanto genoprotetora dependendo da concentração;
- Apresenta algumas limitações que podem ser abreviadas com o uso concomitantemente com outras técnicas que utilizam sistemas biológicos.

REFERÊNCIAS

AHN, S. J., COSTA, J., EMANUEL, J. R. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v 24, n. 13, p. 2623-2625, 1996.

AMBROSONE, C. B., FREUDENHEIM, J. L., THOMPSON, P. A., BOWMAN, E., VENA, J. E., MARSHALL, J. R., GRAHAM, S., LAUGHLIN, R., NEMOTO, T., SHIELDS, P. G. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. **Cancer Res.** v. 59, p. 3, p. 602-606, 1999.

AMES, B. N., DURSTON, W. E., YAMASAKI, E., LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 70, p. 2281–2285, 1973.

AMES, B.N., J. MCCANN, E. YAMASAKI. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. **Mutation Res.**, v. 31, p. 347–364, 1975.

AZQUETA, A., COSTA, S., LORENZO, Y., BASTANI, N. E., COLLINS, A. R. Vitamin C in Cultured Human (HeLa) Cells: Lack of Effect on DNA Protection and Repair. **Nutrients.**, v. 5, n. 4, p. 1200-1217, 2013.

BELIN, S., KAYA, F., DUISIT, G., GIACOMETTI, S., CICCOLINI, J., FONTÉS, M. Antiproliferative effect of ascorbic acid is associated with the inhibition of genes necessary to cell cycle progression. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4409, 2009.

BERLO, D. V., CLIFT, M., ALBRECHT, C., SCHINS, R. Carbon nanotubes: an insight into the mechanisms of their potential genotoxicity. **Swiss Med Wkly.**, v. 142, n. w13698, p. 1-16, 2012.

BICA, C. G., DA SILVA, L. L., TOSCANI, N. V., ZETTLER, C. G., GOTTLIEB, M. G., ALEXANDRE, C. O., GRAUDENZ, M. S., MÂNICA DA CRUZ, I. B. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 196, n. 2, p 153-158, 2010.

BIGGER, T.R.L., SAVAGE, J.R.K.: Mapping G-bands on human prophase chromosomes. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 15, n. 2, p. 112–121, 1975.

BITTENCOURT, L. S., MACHADO, D. C., MACHADO, M. M., DOS SANTOS, G. F., ALGARVE, T. D., MARINOWIC, D. R., RIBEIRO, E. E., SOARES, F. A., BARBISAN, F., ATHAYDE, M. L., CRUZ, I. B. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodiumnitroprusside. **Food Chem Toxicol.**, v. 53, p.119-25, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie. **Food Scien and Technol.** v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

CAI, Q., SHU, X. O., WEN, W., CHENG, J. R., DAI, Q., GAO, Y.T., ZHENG, W. Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. **Breast Cancer Res.**, v. 6, n. 6, p. 647-655, 2004.

COSTA, F., DORNELLES, E., MÂNICA-CATTANI, M. F., ALGARVE, T. D., SOUZA FILHO, O. C., SAGRILLO, M. R., GARCIA, L. F., CRUZ, I. B. M. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reprod Biomed Online**, v. 24, n. 4, p. 474- 481, 2012.

DEL, R. D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v. 15, n. 4, p. 316–328, 2005.

DRAGAN, A. I., CASAS-FINET, J. R., BISHOP, E. S., STROUSE, R. J., SCHENERMAN, M. A., GEDDES, C. D. Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement uponbinding. **Biophys J.**, v. 99, n. 9, p. 3010-3019, 2010.

EL-ZEIN, R. A., FENECH, M., LOPEZ, M. S., SPITZ, M. R., ETZEL, C. J. Cytokinesis-Blocked Micronucleus Cytome Assay Biomarkers Identify Lung Cancer Cases Amongst Smokers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 77, n. 5, p 1111–1119, 2008.

FAIRBAIRN, D. W., OLIVE, P. L., O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res.**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FAITA F., CORI, L., BIANCHI, F., ANDREASSI, M. G. Arsenic-Induced Genotoxicity and Genetic Susceptibility to Arsenic-Related Pathologies. **Int J Environ Res Public Health**, v. 10, n. 4, p. 1527-1546, 2013.

FIKROVÁ, P. STETINA, R., HRONEK, M., HYSPLER, R., TICHÁ, A., ZADÁK, Z. Application of the comet assay method in clinical studies, **Cent Eur J Med.** v. 123, n. 23-24, p. 693-699, 2011.

FISCHER, S. G. L., PEREZ, R. S. G. M., NOUTA, J., ZUURMOND, W. W. A., SCHEFFER, P. G. Oxidative Stress in Complex Regional Pain Syndrome (CRPS): No Systemically Elevated Levels of Malondialdehyde, F2-Isoprostanes and 8OHdG in a Selected Sample of Patients. **Int J Mol Sci.**, v. 14, n. 4, p. 7784-7794, 2013.

FRONZA, A.B.; BARRETO, D.C.M.; TOCHETTO, T.M. CRUZ, I.B.M.; SILVEIRA, A.F. Association between auditory pathway efferent functions and genotoxicity in young adults. **Braz J Otorhinolaryngol.** v. 77, p. 107-114, 2011.

FUKUMASU, H., AVANZO, J. L., NAGAMINE, M. K., BARBUTO, J. A., RAO, K. V., DAGLI, M. L. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Braz J Med Biol Res.**, v. 41, n. 4, p. 305-310, 2008.

FUKUSHIMA, S., KINOSHITA, A., PUATANACHOKCHAI, R., KUSHIDA, M., LWANIBUCHI, H., MORIMURA, K. Hormesis And Dose-Response-Mediated Mechanisms In Carcinogenesis: Evidence For A Threshold In Carcinogenicity Of Non-Genotoxic Carcinogens. **Carcinogenesis.**, v. 26, n. 11, p. 1835-1845, 2005.

GARCÍA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E.; ALVAREZ, A. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutat Res.** v. 556, n. 1-2, p. 25-34, 2004.

GERHAUSER, C. Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges. **Top Cur Chem.**, v. 329, p. 73-132, 2013.

HÁ, T.T.N., HUY, N.T., MURAO, L.A., LAN, N.T.P., THUY, T.T. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **PLoS One**, Nagasaki, v. 6, n. 10, p. 259-269, 2011.

HUNG, R. J., BOFFETTA, P., BRENNAN, P., MALAVEILLE, C., GELATTI, U., PLACIDI, D., CARTA, A., HAUTEFEUILLE, A., PORRU, S. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. **Carcinogenesis.**, v. 25, n. 6, p. 973-978, 2004.

JANTOVA, S., BAKOS, D., BIROSOVA, L., MATEJOV, P. Biological properties of a novel coladerm-beta glucan membrane. *In vitro* assessment using human fibroblasts. **Interdiscip Toxicol.**, v. 5, n. 4, p. 201–206, 2012.

KIRSCH-VOLDERS, M., DECORDIER, I., ELHAJOUJI, A., PLAS, G., AARDEMA, J. M., FENECH, M. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1 p. 177–184, 2011.

KLUNGLAND, A., BJELLAND, S. Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. **DNA Repair**, v. 6, n. 4, p. 481-488, 2007.

KNOBEL, Y., GLEI, M., WEISE, A., OSSWALD, K., SCHAFFERHENRICH, A., RICHTER, K. K., CLAUSSEN, U., POOL-ZOBEL, B. L. Uranyl Nitrotriacetate, a Stabilized Salt of Uranium, is Genotoxic in Nontransformed Human Colon Cells and in the Human Colon Adenoma Cell Line LT97. **Toxicol Sci.**, v. 93, n. 2, p. 286–297, 2006.

KOHATSU, A. G. S.; SHIMABUKURO, F.; GATTÁSG. J. F. Utilização dos testes de mutagenicidade para a avaliação de exposição ocupacional. **Saúde, Ética & Justiça.**, v.12, n.1/2, p. 15-21, 2007.

KUMMROW, F., MARTINS, R. S. L., LELIS, C. M., RECH, C. M., MATTA, M. E. M., UMBUZEIRO, G. A. Caracterização da Mutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos de lodos tratados de cinco estações de tratamento de esgoto (ETE) localizadas no Estado de São Paulo. **Revinter Inter Tox**, v. 3, n. 3, p. 18-27, 2010.

LEBEL, C. P., ISCHIROPOULOS, H. BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol.**, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

MAHADEVAN, B., SNYDER, R. D., WATERS, M. D., BENZ, R. D., KEMPER, A. R., TICE, R. R., RICHARD, A. M. Genetic Toxicology in the 21st Century: Reflections and Future Directions. **Environ Mol Mutagen.**, v. 52, n. 5, p. 339–354, 2011.

MAO, C., QIU, L. X., ZHAN, P., XUE, K., DING, H., DU, F. B., LI, J., CHEN, Q. MnSOD Val16Ala polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis involving 8,962 subjects. **J. Cancer Res Clin Oncol.**, v. 136, n. 7, p. 975-979, 2010.

MARTIN, R. C., BARKER, D. F., DOLL, M. A., PINE, S. R., MECHANIC, L., BOWMAN, E. D., HARRIS, C. C., HEIN, D. W. Manganese superoxide dismutase

gene coding region polymorphisms lack clinical incidence in general population. **DNA Cell Biol.** v. 27, n. 4, p. 321-323, 2008.

MONTAGNER, G. F. S., SAGRILLO, M., MACHADO, M. M., ALMEIDA, R. C., MOSTARDEIRO, C. P., DUARTE, M. M., CRUZ, I. B. M. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicol In Vitro.**, v. 24, n. 5, p.1410-1416, 2010.

MOON, J. K., SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **J. Agric Food Chem.**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MOSMAN, T.I.M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NIWA A. M., OLIVEIRA, R. J., MANTOVANI, M. S. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of soy phytoestrogens using micronucleus and comet assays of the peripheral blood of mice. **Genet Mol Res.**, v. 12, n. 1, p. 519-527, 2013.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OSTROVSKY, G. Cancer and Aging: FISH-ing for Links. **MedGadget.** 2007.

PROVOST, G. S., KRETZ, P. L., HAMNER, R. T., MATTHEWS, C. D., ROGERS, B. J., LUNDBERG, K. S., DYCAICO, M. J., SHORT, J. M. Transgenic systems for in vivo mutation analysis. **Mutat Res.**, v. 288, n. 1, p. 133-149, 1993.

RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. J. F.; CARVALHO, M. B.; SALDANHA, P. H. Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. **Oral Oncology.**, v. 6, n. 2, p. 199-204, 1999.

RAMIREZ, T., BENITEZ-BRIBIESCA, L., OSTROSKY-WEGMAN, P., HERRERA, L. A. *In vitro* effects of albendazole and its metabolites on the cell proliferation kinetics and micronuclei frequency of stimulated human lymphocytes. **Arch Med Res.**, v. 32, n. 2, p. 119-22, 2001.

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. **Exp Cell Res.** v. 175, n. 1, p. 184-91, Mar. 1988.

SRAM, R. J., BINKOVA, B., ROSSNER, P. JR. Vitamin C for DNA damage prevention. **Mutat Res.**, v. 733, n.1-2, p. 39-49, 2012.

STIRLING, P. C., BLOOM, M. S., SOLANKI-PATIL, T., SMITH, S., SIPAHIMALANI, P., LI, Z., KOFOED, M., BEN-AROYA, S., MYUNG, K., HIETER, P. The Complete Spectrum of Yeast Chromosome Instability Genes Identifies Candidate CIN Cancer Genes and Functional Roles for ASTRA Complex Components. **PloS Genetics**, v. 7, n. 4, p. e1002057, 2011.

TAJBAKSH, J. DNA methylation topology: potential of a chromatin landmark for epigenetic drug toxicology. **Epigenomics**, v. 3, n. 6, p. 761-70, 2011.

TAMIMI, R. M., HANKINSON, S. E., SPIEGELMAN, D., COLDITZ, G. A., HUNTER, D. J. Manganese superoxide dismutase polymorphism, plasma antioxidants, cigarette smoking, and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v.13, n. 6, p. 989-996, 2004.

TAUFER, M., PERES, A., DE ANDRADE, V. M., DE OLIVEIRA, G., SÁ, G., DO CANTO, M. E., DOS SANTOS, A. R., BAUER, M. E., DA CRUZ, I. B. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 60, n. 4, p. 432- 438, 2005.

TEJS, S. The Ames test: a methodological short review. **Environ Biotechnol.**, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2008.

TORRES-BUGARÍN, O., COVARRUBIAS-BUGARÍN, R., ZAMORA-PEREZ, A. L., TORRES-MENDOZA, B. M., GARCÍA-ULLOA, M., MARTÍNEZ-SANDOVAL, F. G. Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. **Br J Sports Med.**, v. 41, n. 9, p. 592-596, 2007.

WANG, G., ALAMURI, P., HUMAYUN, M.Z., TAYLOR, D.E., MAIER, R.J. The Helicobacter pylori MutS protein confers protection from oxidative DNA damage. **Mol Microbiol.**, v. 58, n. 1, p. 166-176, 2005.

YUNIS, J. J., Sawyer, J. R., Ball, D. W. High resolution of human chromosomes G-banded chromosomes of man. **Chromosoma**, v. 67, n. 4, p. 293-307, 1978.

ZEJNILOVIC, J., AKEV, N., YILMAZ, H., ISBIR, T. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 189, n. 1 , p. 1-4, 2009.

ZYCHLINSKY, A., PREVOST, M. C., SANSONETTI, P. J., Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages, **Nature**, v. 358, p. 167-169, 1992.