



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**EFEITO MODULADOR DO (+)-ÁCIDO ÚSNICO SOBRE OS DANOS GENOTÓXICOS,  
MUTAGÊNICOS E CARCINOGENÉTICOS INDUZIDOS POR DIFERENTES AGENTES  
QUÍMICOS *in vivo* E *in vitro***

**Aluna: Nayane Moreira Machado**

**Orientador:** Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

**Co-Orientadores:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Crispim Tavares

Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

**UBERLÂNDIA - MG  
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**EFEITO MODULADOR DO (+)-ÁCIDO ÚSNICO SOBRE OS DANOS  
GENOTÓXICOS, MUTAGÊNICOS E CARCINOGENÉTICOS INDUZIDOS POR  
DIFERENTES AGENTES QUÍMICOS *in vivo* E *in vitro***

**Aluna: Nayane Moreira Machado**

**Orientador:** Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

**Co-Orientadores:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Crispim Tavares

Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos requisitos para  
obtenção do Título de Doutor em Genética e  
Bioquímica (Área: Genética)**

**UBERLÂNDIA - MG**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M149e Machado, Nayane Moreira, 1987  
2017 Efeito modulador do (+)-ácido úsnico sobre os danos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos induzidos por diferentes agentes químicos in vivo e in vitro [recurso eletrônico] / Nayane Moreira Machado. - 2017.

Orientador: Mário Antônio Spanó.

Coorientadora: Denise Crispim Tavares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1216>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. 2. Líquens. 3. Tumores. 4. Testes para Micronúcleos. I. Spanó, Mário Antônio, , (Orient.). II. Tavares, Denise Crispim, , (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

---

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.**

Defesa: Tese de Doutorado, nº 01/2017- PPGGB

Local: Uberlândia/MG

Data: 13/07/2017 Hora de início: 13:00h

Discente: Nayane Moreira Machado

Matrícula: 11323GBI009

Título do Trabalho: Efeitos moduladores do (+) – ácido úsnico sobre efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos de diferentes agentes químicos *in vivo* e *in vitro*.

Área de concentração: Genética

Linha de pesquisa: Mutagênese

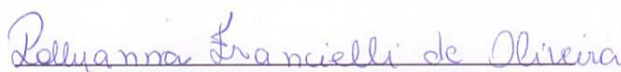
Projeto de Pesquisa de vinculação: Efeitos moduladores do (+) – ácido úsnico sobre efeitos genotóxicos de diferentes agentes químicos *in vivo* e *in vitro*.

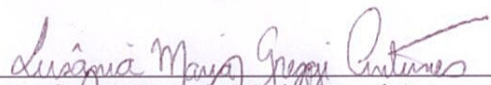
Aos treze dias do mês de julho de dois mil e dezessete, às 13:00 horas no Bloco 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Pollyana Francielli de Oliveira; Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lusânia Maria Gregg Antunes; Prof. Dr. Boscolli Barbosa Pereira; Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Morelli e Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, o Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a): APROVADO (A).

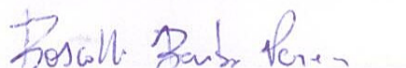
Caso haja mudança no Título da Tese, informe o novo título ou demais sugestões:

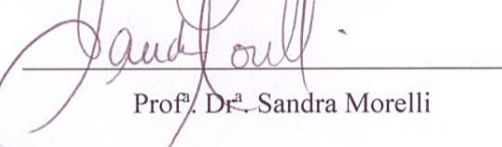
Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

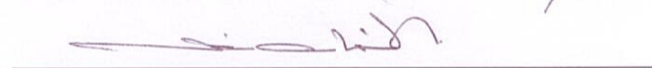
Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17 horas e 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Pollyana Francielli de Oliveira

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lusânia Maria Gregg Antunes

  
Prof. Dr. Boscolli Barbosa Pereira

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Morelli

  
Prof. Dr. Mário Antônio Spanó  
Orientador



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**EFEITO MODULADOR DO (+)-ÁCIDO ÚSNICO SOBRE OS DANOS  
GENOTÓXICOS, MUTAGÊNICOS E CARCINOGENÉTICOS INDUZIDOS POR  
DIFERENTES AGENTES QUÍMICOS *in vivo* E *in vitro***

**ALUNA:** Nayane Moreira Machado

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Mário Antônio Spanó (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Boscolli Barbosa Pereira (UFU)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lusânia Maria Greggi Antunes (USP)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Pollyanna Francielli de Oliveira (UNIFRAN)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Morelli (UFU)

**Data da Defesa:** 13/07/2017

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Dedico este trabalho:

À minha querida família: pai, mãe, irmãos,  
cunhadas e sobrinha.

Ao meu amado marido, Marcelo, e à minha doce  
espera Helena.

Ao meu grande incentivador, Prof. Dr. Júlio César  
Nepomuceno (*in memoriam*).



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, e à **Santa Rita de Cássia** pelas bênçãos derramadas em todo esse processo de crescimento, tanto profissional quanto pessoal, pelo amparo nas minhas tribulações e pela oportunidade de alcançar mais essa vitória em minha vida.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**, pelo acolhimento, generosidade, gentileza e contribuição em todas as etapas. É uma honra e orgulho tê-lo como orientador. Meus eternos agradecimentos pelos ensinamentos e sua inestimável confiança.

À **Profª Drª Denise Crispim Tavares**, pela disponibilidade, colaboração e fornecimento do ácido úsnico. Obrigada por ter aberto as portas de seu laboratório e pela participação ativa na construção deste trabalho. Agradeço também a toda sua equipe, em especial à **MSc Heloiza Nicolella** e ao **MSc Saulo Ozelin**, pela paciência e valiosa colaboração.

Ao Co-orientador **Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende**, pela co-orientação, auxílio nas pesquisas e amizade.

Ao querido e eterno **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno (*in memoriam*)**, que me concedeu o privilégio de seus ensinamentos durante 10 anos. A ele agradeço por todo o incentivo, carinho e amizade. Pelos seus valiosos ensinamentos, e por ser fonte de inspiração como profissional e pessoa. A saudade é grande e a minha gratidão é eterna.

À "**Família Labcim**" (membros do Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas), que de alguma forma compartilharam das alegrias e frustrações durante o desenvolvimento do trabalho, e que tornaram a caminhada mais leve, em especial às amigas **Profª Drª Priscila Capelari Orsolin**, **Profª Drª Rosiane Gomes Silva Oliveira**, e

**Prof<sup>a</sup> MsC Bethânia Cristine de Araújo**, pelos anos de amizade, carinho e apoio.

Aos membros da comissão examinadora, **Prof. Dr. Boscolli Barbosa Pereira** (UFU), **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lusânia Maria Gregg Antunes** (USP), **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Pollyanna Francielli de Oliveira** (UNIFRAN), e **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Morelli** (UFU), os meus mais sinceros agradecimentos pela disponibilidade para a leitura cuidadosa deste trabalho, bem como pelas sugestões e contribuições para o seu aprimoramento.

**Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia**, pelos ensinamentos e contribuição em minha formação acadêmica.

À **Janaína de Sousa Mota**, secretária do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Obrigada pela atenção e por toda ajuda prestada.

Àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais do que ninguém e que, seguramente, são os que compartilham da minha alegria:

Aos meus pais, **Ubaldo Machado de Araújo** e **Maria Helena de Araújo**, meus exemplos na construção dos meus valores, obrigada por tudo, principalmente pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, **Carley Alexandre Moreira Machado** e **Helber Moreira Machado**, e às suas esposas **Adriana Claudia Veloso dos Santos** e **Brenda Larissa Almeida**, e à minha sobrinha, **Mariana Santos Machado**, muito obrigada por me encorajarem em todos os aspectos da vida. Amo muito vocês.

Ao meu esposo **Marcelo Guimaraes Brito**, com quem tenho o enorme prazer em compartilhar minha vida e minhas conquistas, sempre compartilhando dos meus anseios e me proporcionando amparo. Obrigado por tornar a minha vida mais feliz e completa.



Ao meu sogro **Márcio Basílio**, à minha sogra **Maria Aparecida**, e aos cunhados e cunhadas **Alessandra, Fernando, Nádia e Gustavo**. Agradeço pelo carinho, presteza e por terem me acolhido tão bem na família. Obrigada por toda a torcida.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – UFU (Uberlândia-MG), em parceria com o Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM (Patos de Minas) e com o Laboratório de Mutagênese da Universidade de Franca (Franca-SP), com o apoio financeiro das seguintes Agências de Fomento e Instituições:

- Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);
- Universidade de Franca (UNIFRAN);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

## Lista de Figuras

### Capítulo I. Fundamentação Teórica

- Figura 1.** Classificação dos líquens: **A.** Crostoso (Ex.: *H. africanum*); **B.** Folioso (Ex.: *B. placophyllus*); **C.** Fruticoso (Ex.: *C. retipora*); **D.** Filamentoso (Ex.: *C. mitis*); **E.** Gelatinoso (Ex.: *C. leptaleum*; e **F.** Dimórficos (Ex.: ***C. floerkeana***). Fonte: Pictures of tropical lichens (Disponível em: <<http://www.tropicallichens.net/1897.html?q=large&id=1897>> Acesso em 05 de abril de 2017) ..... 05
- Figura 2.** Prováveis vias de biossíntese de compostos liquênicos (Adaptado de Culberson e Elix, 1989). ..... 07
- Figura 3.** Estrutura dos enantioméricos: **A.** (+)-ácido úsnico; **B.** (-)-ácido úsnico. (Fonte: PROKOPIEV et al., 2017) ..... 09
- Figura 4.** Representação esquemática dos cruzamentos realizados com as linhagens de *D. melanogaster*. Aspectos fenotípicos dos descendentes gerados e eventos genéticos identificados (Fonte: REZENDE, 2012) ..... 15
- Figura 5.** Fotomicrografia de clones de pelos mutantes em células de asas de *D. melanogaster*, obtidas em microscópio óptico de luz (aumento: 40X): **A.** Pelos normais **B.** Mancha simples, com pelos múltiplos (mwh); **C.** Mancha simples, com pelos flare ( $flr^3$ ); **D.** Mancha gêmea, com pelos múltiplos da asa e pelos *flare* (Fonte: Arquivo do Laboratório de Mutagênese, UFU)..... 16
- Figura 6.** Representação esquemática do cruzamento entre as linhagens *multiple wing hairs* e a linhagem *warts*, e seus descendentes (Fonte: Adaptado de REZENDE, 2012; MORAES, 2015). ..... 18

**Figura 7.** Tumores em tecido epitelial de *D. melanogaster* (setas) observados em microscópio estereoscópico: A. Tumor no tórax: B Tumor na asa (Fonte: Arquivo do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da UNIPAM, Patos de Minas, MG). ..... 19

**Figura 8.** Fotomicrografia de foco de criptas aberrantes (três criptas) em cólon de ratos Wistar (coloração: Azul de metileno; aumento: 100x). (Fonte: Laboratório de Mutagênese - UNIFRAM, Franca – SP)... 21

**Figura 9.** Esquema do bloqueio da citocinese com citocalasina B, induzindo a formação de células binucleadas; e sem citocalasina B, formando células mononucleadas (Fonte: ZALACAIN et al., 2005). ..... 25

## **Capítulo II. Assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of (+)-usnic acid.**

**Fig. 1.** Structural formula of (+)- usnic acid..... 59

**Fig. 2.** Schematic of the experimental procedure with Wistar rats for treatments with (+)-usnic acid (UA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH), using the aberrant crypt foci (ACF) as biomarker..... 60

## **Capítulo III. Evaluation of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of (+)-usnic acid in somatic cells of *Drosophila melanogaster***

**Fig. 1.** Structural formula of (+)- usnic acid..... 84

**Fig. 2.** Survival rates upon exposure to different concentrations (1.25, 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 mM) of usnic acid, and positive control (PC) urethane (10.0 mM) relative to negative control (NC) (1% Tween-80 and 3% ethanol in distilled water) in the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *D. melanogaster*. A: Standard cross; B: High

bioactivation cross. Statistical comparisons of survival rates were made by using Chi-square test for ratios for independent samples.

\*Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).....85

## Lista de Tabelas

### Capítulo II. Assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of (+)-usnic acid.

- Table 1.** Mean and standard deviation of the initial weight, final weight, weight gain and water consumption observed in Wistar rats treated with different concentrations of usnic acid (UA) (3.125; 12.5 or 50.0 mg / kg b.w.) + 1,2-dimethylhydrazine (DMH) (160 mg/kg b.w), Ultrapure water (negative control), Tween 5% (solvent control), DMH (160 mg/kg b.w), and tween 5% + DMH (160 mg/kg b.w) during four weeks for the aberrant crypt foci (ACF) assay..... 61
- Table 2.** Mean and standard deviation of aberrant cript foci (ACF) and aberrant cript (AC) observed in distal colon of Wistar rats treated with different concentrations of usnic acid (UA) (3.125; 12.5 or 50.0 mg / kg b.w.) + 1,2-dimethylhydrazine (DMH) (160 mg/kg b.w), Ultrapure water (negative control), Tween 5% (solvent control), DMH (160 mg/kg b.w), and tween 5% + DMH (160 mg/kg b.w) during four weeks for the aberrant crypt foci (ACF) assay.....62
- Table 3.** Frequency of micronuclei (MN) and nuclear division index (NDI) observed in Chinese hamster ovary (CHO) cells treated with different concentrations of usnic acid (UA) (7.5; 15 or 30 µg/mL) alone or combined with DXR (0.5 µg/mL), ultrapure water (negative control), DMSO (solvent control) and DMSO + DXR (positive control).....63

**Capítulo III. Evaluation of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of (+)-usnic acid in somatic cells of *Drosophila melanogaster***

**Table 1.** Summary of results obtained in the marked trans-heterozygous descendants (MH) and balancer-heterozygous (BH) of *Drosophila melanogaster* derived from the tandard cross (ST) and high bioactivation cross (HB) treated with different concentrations of the usnic acid (UA), positive control (URE) (Urethane10mM) and negative control (Tween-80 and 3% ethanol in distilled water).....86

**Table 2.** Tumor clone frequency observed in *Drosophila melanogaster* heterozygote for the wts tumor suppressor gene, treated with different usnic acid (UA) concentrations, positive control (Doxorubicin – DXR) and negative control.....87



## Resumo

O ácido úsnico (AU) é um dos mais abundantes metabólitos secundários obtido de líquens. O qual apresenta uma ampla atividade terapêutica com potencial antibiótico, antitumoral, antituberculostático, antiviral, anti-inflamatório, analgésico, antipirético, antimetabólico, antimicótico, antiproliferativo, antifúngico, antiprotozoário e anti-histamínico. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do AU sobre: 1] lesões colorretais pré-neoplásicas induzidas pela 1,2-dimetilidrazina (DMH) utilizando o ensaio de focos de criptas aberrantes (FCA) em ratos Wistar, como biomarcador; 2] a atividade citotóxica, genotóxica e moduladora do AU sobre a genotoxicidade induzida pela doxorubicina (DXR) em células de ovário de hamster chinês (CHO), utilizando o teste do micronúcleo por bloqueio da citocinese; 3] as atividades mutagênica, recombinogênica e carcinogênica do AU em *Drosophila melanogaster* usando, respectivamente, o Teste de Mutação e Recombinação Somáticas (SMART) e o teste para a detecção de clones de tumor epitelial (wts). No ensaio FCA, ratos Wistar machos foram tratados com DMH (40 mg / kg p.c.) duas vezes por semana durante duas semanas. O AU foi administrado em diferentes concentrações (3,125; 12,5 ou 50 mg / kg). Também foram incluídos controles negativo (água ultrapura), Tween 5% (controle solvente), controle solvente + DMH e controle positivo (DMH 160 mg / kg p.c.). Os animais que receberam as diferentes concentrações de AU em associação com DMH demonstraram reduções estatisticamente significativas nos valores de FCA e criptas aberrantes (AC) quando comparados ao grupo tratado com DMH sozinho. No ensaio de micronúcleo, o AU (7,5; 15 ou 30 µg / mL) isoladamente foi avaliado quanto à possível genotoxicidade; e o AU (3,75; 7,5; ou 15 µg / mL) combinado com DXR (0,5 µg / mL) para a antigenotoxicidade. Também foram incluídos controles negativo (água ultra pura e solvente DMSO a 0,3 µM) e positivo (DXR 0,5 µg / mL). As células tratadas com AU (30 µg / mL) induziram aumento significativo na frequência de micronúcleos quando comparado ao controle negativo. Para SMART, larvas de  $72 \pm 4$  h de *Drosophila* foram alimentadas com AU (5,0, 10,0 ou 20,0 mM); Uretano (10,0 mM) (controle positivo) e solvente (água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% de etanol) (controle negativo). Foi verificado um aumento na frequência de manchas mutantes no cruzamento padrão - ST para os indivíduos tratados com 5, 10 ou 20 mM de AU. No

cruzamento alta bioativação - HB, indivíduos tratados com 5 mM apresentaram aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes, enquanto que nas concentrações mais elevadas o resultado foi negativo, o que pode ser atribuído, em parte, aos níveis elevados de P450, sugerindo que o aumento da capacidade metabólica maximizou o efeito tóxico dessas doses, ou efeito antioxidante do AU. Na avaliação da carcinogênese pelo teste Wts, os resultados obtidos, para as mesmas concentrações de UA empregadas no SMART, mostram um resultado positivo para a presença de tumores quando comparados ao controle negativo. Concluímos que a UA possui efeitos recombinogênicos, mutagênicos e carcinogênicos em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. As propriedades antioxidantes e pró-oxidantes do AU são susceptíveis de explicar os resultados observados.

**Palavras chave:** ácido úsnico; tumor; smart; warts; focos de criptas aberrantes; ensaio de micronúcleo.

## ABSTRACT

Usnic acid (UA) is one of the most common and abundant lichen metabolites. The aim of this study was to investigate the effects of usnic acid (UA) on: 1] pre-neoplastic colorectal lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) using the aberrant crypt foci (ACF) as biomarker in rats; 2] the cytotoxic, genotoxic and modulatory activity of UA on doxorubicin (DXR)-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells, using the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay; 3] the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic activity of UA in *Drosophila melanogaster* using, respectively, the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) and the test for detecting epithelial tumor clones (*wts test*). In FCA assay, male Wistar rats were treated with DMH (40 mg/kg b.w) twice a week for two weeks. UA was administered in dosages of 3.125; 12.5 and 50 mg/kg b.w. Ultrapure water (negative control), Tween 5% (solvent control), solvent control + DMH, and positive control (DMH 160 mg/kg b.w) groups were also included. The animals that received the different doses of UA in association with DMH demonstrated statistically significant reductions in the ACF and aberrant crypts (AC) values when compared to the group treated with DMH alone. In the CBMN assay, UA (7.5; 15 or 30  $\mu\text{g/mL}$ ) alone was examined for genotoxicity, and combined with DXR (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) for antigenotoxicity. Negative, solvent (DMSO, 0.3  $\mu\text{M}$ ) and positive (DXR 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) controls were also included. Cells treated with UA (30  $\mu\text{g/mL}$ ) induced significant increase in micronuclei frequency when compared to the negative control. For SMART, Larvae of  $72\pm 4$  h from *Drosophila* were fed with UA (5.0, 10.0 or 20.0 mM); urethane (10.0 mM) (positive control); and solvent (Milli-Q water, 1% Tween-80 and 3% ethanol) (negative control). ST cross produced increase in total mutant spots in the individuals treated with 5, 10 or 20 mM of UA. HB cross produced spot frequencies in the concentration of 5 mM that were higher than the frequency for the same concentration in the ST cross. In the highest concentrations the result was negative, which means that the difference observed can be attributed, in part, to the high levels of P450, suggesting that increasing the metabolic capacity maximized the toxic effect of these doses. In the evaluation of carcinogenesis using the *wts test*, the results obtained for the same concentrations of UA show a positive result for the presence of tumors when compared to the negative control. We conclude that

UA has recombinogenic, mutagenic and carcinogenic effects on somatic cells in *D. melanogaster*. The antioxidant and pro-oxidant properties of UA are likely to account for the present results.

**Key words:** usnic acid; tumor; smart; warts; aberrant cript foci; micronuclei assay.

## SUMÁRIO

	Página
<b>Apresentação</b> .....	01
<b>Capítulo 1. Fundamentação Teórica</b>	
1. Líquens e substâncias liquênicas.....	04
2. Ácido úsnico.....	08
3. Drosophotoxicologia.....	12
4. Teste para detecção de mutação e recombinação somática.....	12
4.1. Linhagens mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	13
4.2. Cruzamentos.....	13
4.3. Alterações genéticas diagnosticadas por meio da análise das asas.....	15
5. Teste para detecção de clones de tumores epiteliais ( <i>warts</i> ) em <i>D.</i> <i>melanogaster</i> .....	17
5.1. Cruzamento e Análise.....	18
6. Ensaio de Focos de criptas aberrantes.....	20
7. Teste do Micronúcleo.....	23
8. Referências.....	26
<b>Capítulo II. Assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of (+)-usnic acid</b> .....	38
<b>Capítulo III. Evaluation of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of (+)-usnic acid in somatic cells of <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	63
<b>Conclusões gerais</b> .....	88
<b>Apêndice</b> .....	89

---

---

# APRESENTAÇÃO

---

---





## 1. Apresentação

Líquens são organismos simbióticos compostos por um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobionte), produtores de metabólitos especiais, denominados substâncias liquênicas, também conhecidos como ácidos liquênicos. As transformações sintéticas dos metabólitos das plantas representam uma importante área da toxicologia, que pode produzir novas e eficazes drogas. Metabólitos com atividades biológicas inerentes estão sendo utilizados a cada dia de forma mais eficiente na síntese de novos fármacos.

O interesse farmacológico em líquens reside justamente na atividade biológica dos seus metabólitos especiais, que podem ser explorados para diversos fins terapêuticos. A maioria das substâncias liquênicas são substâncias fenólicas, dibenzofuranos, para-depsídeos, depsidonas, lactonas e derivados de ácido pulvínico.

O ácido úsnico (AU) é o metabólito mais comum e abundante dos líquens, derivado do dibenzofurano. É encontrado na natureza em duas formas enantioméricas (+)-ácido úsnico, e (-)-ácido úsnico, as quais dependem da projeção do grupo metila angular localizado na posição do carbono quiral 9b. É um constituinte abundante em diversos gêneros de líquens filogeneticamente distintos, tais como *Usnea*, *Cladonia*, *Cetraria*, *Ramalina*, *Parmelia*, *Alectoria*, *Lecanora* e *Evernia*.

O AU tem apresentado uma vasta gama de atividades biológicas, entre elas: atividade antimicrobiana; antifúngica; antineoplásica; antiviral; antipirética; anti-inflamatória; analgésica; antiprotozoária; inseticida; hidratante e anti-histamínica. No entanto, mesmo apresentando diversas atividades biológicas, a utilização do AU na terapêutica é limitada, devido a propriedades físico-químicas desfavoráveis, como a sua baixa solubilidade e, especialmente, a sua hepatotoxicidade quando ingerido por via oral em mamíferos. Vários estudos revelaram que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e deficiência mitocondrial, como inchaço mitocondrial, fosforilação oxidativa, desacoplamento e inibição, estão associados à hepatotoxicidade do AU. Coletivamente, estes resultados indicam que as mitocôndrias são os alvos prováveis para a toxicidade do composto liquênico.

Este trabalho, enquanto pesquisa básica, teve como finalidade contribuir com informações sobre as atividades biológicas do AU, por meio de: 1]

avaliação *in vivo* dos efeitos mutagênicos e recombinogênicos do AU em células somáticas de asas de *Drosophila melanogaster*, utilizando o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART – Somatic Mutation and Recombination Test); 2] Avaliação *in vivo* do potencial carcinogênico do AU empregando o teste para detecção de clones de tumor epitelial (*wts*) em *D. melanogaster*; 3] avaliação da atividade quimiopreventiva do AU em associação com o carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH), por meio do teste de focos de criptas aberrantes (FCA) em ratos Wistar; e 4] avaliação das atividades citotóxica, genotóxica e moduladora do AU sobre a genotoxicidade induzida pela doxorubicina em células de ovários de hamster chinês (*Cricetulus migratorius*) (células CHO).

O AU foi obtido pelo Prof. Dr. Wilson Roberto Cunha e gentilmente cedido pela Profa. Dra. Denise Crispim Tavares, ambos da Universidade de Franca (UNIFRAN).

As linhagens mutantes de *D. melanogaster* foram fornecidas pelo Dr. Ulrich Graf, do Institute of Toxicology (ETH) and University of Zurich, Schwerzenbach, Suíça. Os testes para detecção de mutação e recombinação somática, e para detecção de clones de tumor epitelial foram realizados no Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia.

Os testes para avaliação da atividade quimiopreventiva do AU por meio do teste FCA e os testes para detecção de micronúcleos em células binucleadas CHO foram realizados na UNIFRAN, sob a co-orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Crispim Tavares.

A apresentação deste trabalho foi dividida nos seguintes capítulos:

**1.1. CAPÍTULO I** - Fundamentação teórica, que apresenta uma avaliação literária a que se propõe o trabalho, contemplando informações sobre líquens e suas substâncias liquênicas, bem como discute a ação do AU e, posteriormente, os testes empregados para avaliação da mutagenicidade e carcinogenicidade em *D. melanogaster*, ensaio de formação dos focos de criptas aberrantes em ratos Wistar, e avaliação da atividade citotóxica, genotóxica e moduladora do AU sobre a genotoxicidade induzida por diferentes mutágenos em células CHO.

- 12. CAPÍTULO II:** Apresenta o manuscrito intitulado “Assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of (+)-usnic acid”, que avalia o potencial quimiopreventivo do AU na carcinogênese coloretal de ratos Wistar *in vivo*; e o potencial genotóxico, antigenotóxico e citotóxico do AU *in vitro*, por meio dos ensaios de focos de criptas aberrantes e do micronúcleo por bloqueio da citocinese, respectivamente. Esse manuscrito foi redigido na língua inglesa, seguindo as normas de formatação periódico “*Food and Chemical Toxicology*” (Fator de impacto 3.778).
- 13. CAPÍTULO III:** Apresenta o manuscrito intitulado “Evaluation of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of (+)-usnic acid in somatic cells of *Drosophila melanogaster*”, publicado no periódico “*Food and Chemical Toxicology*” (Fator de impacto 3.778), em agosto de 2016 (v.96, p. 226-233). O artigo foi redigido em língua inglesa, seguindo as normas de formatação do referido periódico.

---

---

# **CAPÍTULO I**

## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

---



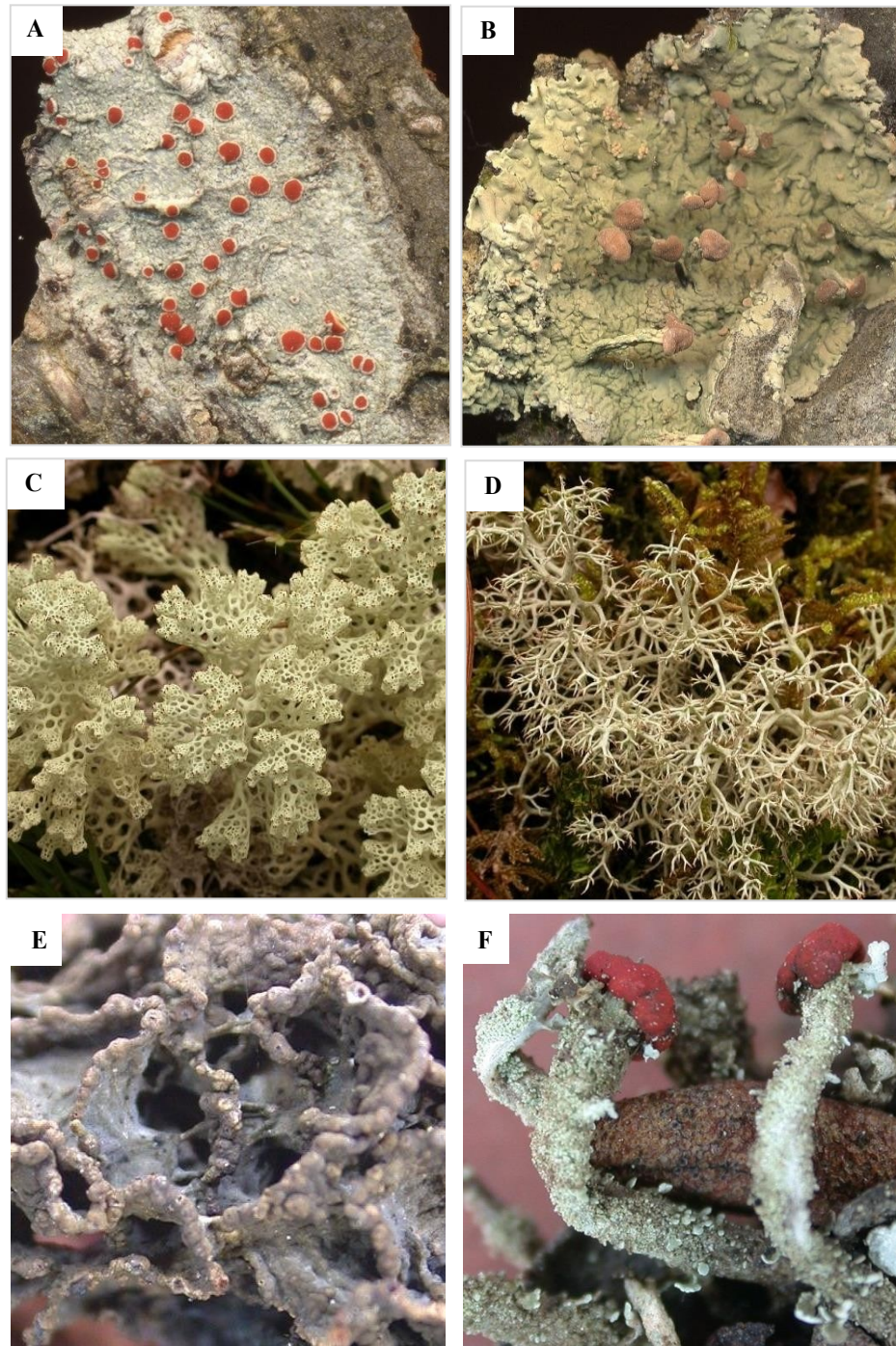
## 1. Líquens e substâncias liquênicas

Líquens são associações simbióticas compostas por um fungo (micobionte) e um ou mais participantes fotossintéticos (fotobionte), que pode ser uma alga verde ou uma cianobactéria (SHRESTHA; ST CLAIR; 2013). Essa simbiose exclusiva e característica dos líquens propicia uma vida harmônica entre fungos e algas. O contato entre o fotobionte e o micobionte confere vantagens para ambos, como por exemplo, proteção mútua e transferência de substâncias vitais, como nutrientes e produtos fotossintéticos (LÜCKING et al., 2014).

Os líquens apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados dos trópicos aos pólos. Por serem capazes de se adaptar a uma grande variedade de condições ambientais, colonizam uma ampla gama de superfícies, e são frequentemente encontrados em cascas de árvore, rochas expostas, e como parte de crosta de solo biológico (LUTZONI; MIADLIKOWSKA, 2009). Sua capacidade adaptativa ao meio se deve à organização de sua estrutura, cuja associação entre córtex superior e as substâncias liquênicas cristalizadas sobre as hifas do fungo, fornecem maior capacidade de resistência às adversidades do meio (NASH, 2008).

Os líquens são classificados em Crostosos - Ex.: *Haematomma africanum* (J. Steiner) C.W. Dodge (**Figura 1. A**), Foliosos - Ex.: *Baeomyces placophyllus* Ach (**Figura 1. B**), Fruticosos - Ex.: *Cladia retipora* (Labill.) Nyl (**Figura 1. C**), Filamentosos - Ex. *Cladonia mitis* Sandst (**Figura 1. D**), Gelatinosos - Ex.: *Collema leptaleum* Tuck (**Figura 1. E**), e Dimórficos – Ex.: *Cladonia floerkeana* (Fr.) Flörke (**Figura 1. F**).

Os líquens do tipo Crostoso aderem-se ao substrato sobre o qual se desenvolvem por meio de estruturas semelhantes a raízes, denominadas rizinas. Os Foliosos têm estrutura semelhante a folhas. Os Fruticosos têm desenvolvimento que lembra a estrutura de um fruto. Os Filamentosos possuem estrutura com o formato de filamentos. Os Gelatinosos têm consistência de gelatina e devem sua forma às algas que o compõem. Os Dimórficos têm seus tamanhos e formatos variados, sendo encontrados em diversos tipos de substratos (EVERT; EICHHORN, 2010).



**Figura 1.** Classificação dos líquens: **A.** Crostoso (Ex.: *H. africanum*); **B.** Folioso (Ex.: *B. placophyllus*); **C.** Fruticoso (Ex.: *C. retipora*); **D.** Filamentoso (Ex.: *C. mitis*); **E.** Gelatinoso (Ex.: *C. leptaleum*; e **F.** Dimórficos (Ex.: *C. floerkeana*). Fonte: Pictures of tropical lichens (Disponível em: <<http://www.tropicallichens.net/1897.html?q=large&id=1897>> Acesso em 05 de abril de 2017).



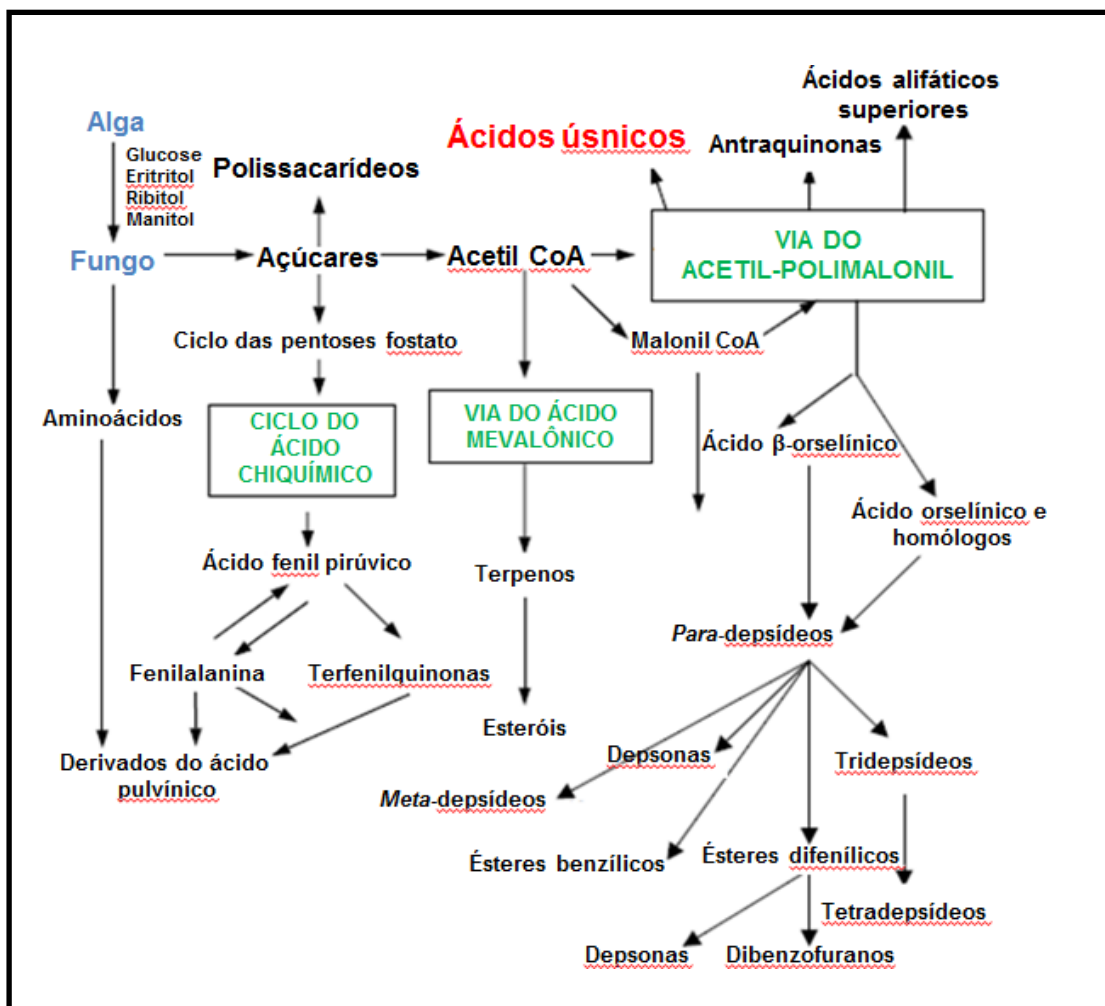
O produto do metabolismo primário dos líquens consiste na produção específica de um único carboidrato pela alga, a partir da fotossíntese, cuja transferência ao micobionte é rápida e em quantidade substancial, o que facilita seu acúmulo ou transformação por meio do metabolismo especial. Nesta segunda via são produzidas as substâncias ou ácidos liquênicos, conhecidos como substâncias com traços fenólicos, consideradas protetoras naturais do talo (MARTINS et al., 2014). Cerca de 550 produtos naturais são descritos para os líquens, dos quais 350 são metabólitos especial (HONDA; VILEGAS, 1999).

Os compostos fenólicos, derivados de substâncias liquênidas (alguns únicos na classe), compreendem os compostos derivados de aminoácidos, álcoois de açúcares, ácidos alifáticos, lactonas e macrocíclicas, compostos aromáticos monocíclicos, quinonas, cromonas, xantonas, dibenzofuranos, para-depsídeos, depsidonas, depsonas, terpenóides, esteróides, carotenóides e éteres difenílicos (HOWELL et al., 2003). A maioria dos metabólitos secundários é derivada da via do acetil-polimalonil. Outros metabólitos são derivados da via do ácido chiquímico, e outros da via do ácido mevalônico (CULBERSON; ELIX, 1989; ELIX, 1996) (**Figura 2**).

O entusiasmo científico com a descoberta das propriedades liquênicas, e suas contribuições para a saúde humana, provocou uma espécie de corrida do ouro visando encontrar novos princípios ativos. Entre as substâncias liquênicas ativas, o ácido úsnico (AU) atraiu o interesse de muitos cientistas (COCCHIETTO et al., 2002)

Uma análise da literatura sobre o AU revela um padrão de três períodos. No primeiro período, desde o fim da Segunda Guerra Mundial até o final da década de 1950, o número de trabalhos foi elevado, refletindo o interesse despertado pela comunidade científica mundial pelo AU, principalmente no que se refere às suas propriedades antibióticas. O segundo período abrange as décadas de 1960 e 1970, e mostra um nível reduzido de interesse pelo AU, provavelmente devido ao sucesso dos antibióticos sintéticos, que foram facilmente fabricados e economicamente mais convenientes. Além disso, a baixa solubilidade em água dos derivados de líquens, e a dificuldade de recolher líquens em grande escala, dificultou a utilização de tais substâncias. O último período abrange o final da década de 80 até o presente, e mostra um renovado interesse pelo AU, provavelmente

devido ao aumento da incidência de resistência pleiotrópica causada pelo uso intensivo de antibióticos (COCCHIETTO et al., 2002).



**Figura 2.** Prováveis vias de biossíntese de compostos liquênicos (Adaptado de Culberson e Elix, 1989).

Sendo assim, os líquens têm se apresentado como uma das fontes mais importantes de compostos biologicamente ativos (BARNES, 2000). São usados como alimento e fonte farmacológica para produção de óleos essenciais e substâncias fixadoras de perfume, cosméticos, corantes de tecidos, graxas e óleos (YANG et al., 2016). Apresentam ação antiviral (CAMPANELLA et al., 2002; SOKOLOV et al., 2009), antimicrobiana (MARTINS et al., 2010) antifúngica (WEI et al., 2008) antitumoral (EINARSDÓTTIR et al., 2010) e inseticida (NIMIS; SKERT, 2006), além de alta atividade citotóxica (BAZIN et al., 2008).

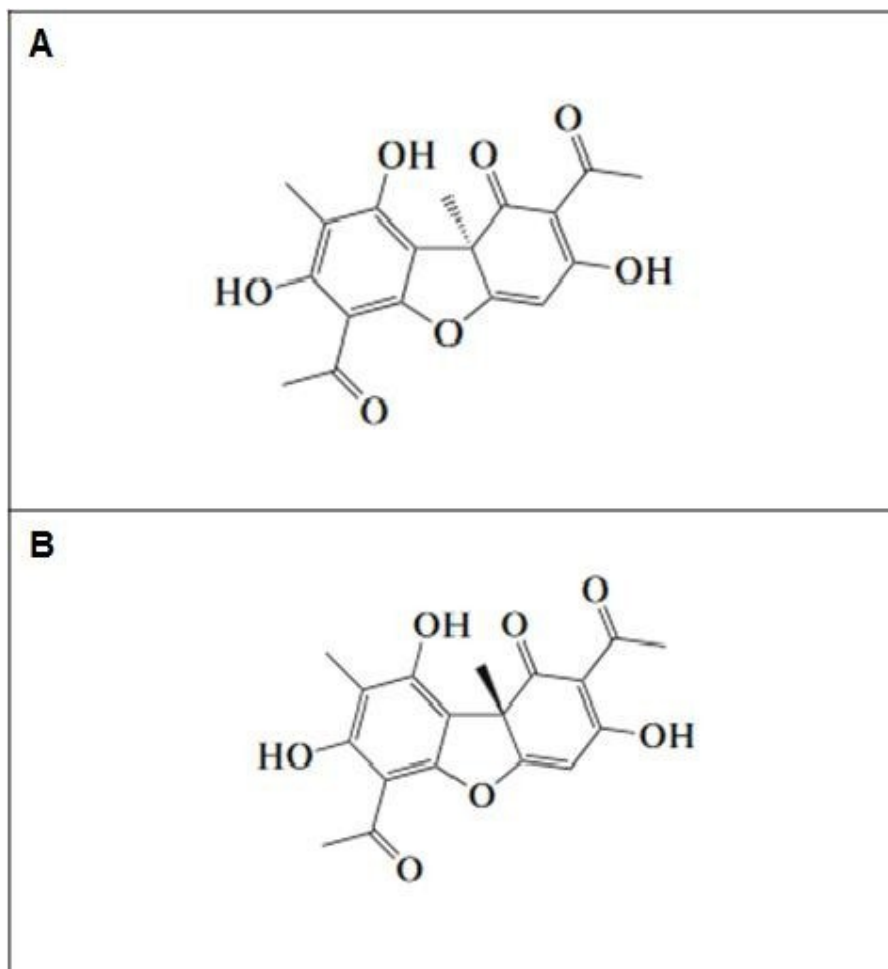
O amplo espectro de atividade biológica chama a atenção constante dos investigadores, considerando que os ácidos liquênicos estão geralmente presentes nos líquens em concentrações relativamente altas e, devido à atividade antioxidante, é provável que contribuam para as defesas antioxidantes dos organismos (HIDALGO et al., 1994). No entanto, é preciso considerar que ácidos liquênicos são substâncias cíclicas com grupos-OH livres, o que os torna quase sempre tóxicos, quando em altas dosagens, para os seres vivos (AIRAKSINEM et al., 1986).

## 2. Ácido úsnico

O ácido úsnico (AU) (2,6 diacetil - 7,9 diidroxi 8,9b dimetil – 1,3 (2H,9BH) – dibenzofurandione,  $C_{18}H_{16}O_7$ ) primeiramente isolado em 1844, caracteriza-se por ser um pigmento cortical amarelo, de baixo peso molecular (344,32g), insolúvel em água e em glicerol, parcialmente solúvel em etanol, e facilmente solúvel em éter, acetona, clorofórmio e acetato de etila (KRISTMUNDSDÓTTIR et al., 2002).

Formas opticamente ativas (+) e (-) de AU diferem nas configurações R e S (formas enantioméricas, dependendo da projeção angular do grupo metil) do Carbono<sup>9b</sup> (Figura 3) (INGÓLFSDÓTTIR, 2002; PROKOPIEV et al., 2017).

Embora muitos autores classifiquem o AU como um grupo dibenzofurano, considera-se que seja formado pela ciclização do tipo floroglucinol, e não pelo tipo orselínica, típica dos dibenzofuranos (TAKANI et al., 2002). Este composto é particularmente abundante em gêneros como *Alectoria*, *Cladonia*, *Evernia*, *Haematomma*, *Lecanora*, *Parmelia*, *Ramalina* e *Usnea* (ZHAO et al., 2010). Porém, *Usnea* e *Alectoria* são gêneros ricos em termos de teor de AU por sintetizarem aproximadamente 6% de ácido de seu próprio peso (ODABASOGLU et al., 2006).



**Figura 3.** Estrutura dos enantioméricos: **A.** (+)-ácido úsnico; **B.** (-)- ácido úsnico (Fonte: PROKOPIEV et al., 2017).

A partir da segunda metade do século XX, centenas de propriedades foram atribuídas a este composto, abrangendo os campos taxonômico, fisiológico, ecológico, cosmético, médico-farmacêutico, e até mesmo agrícola-arboricultural (SHANG et al., 2014). Sabe-se que o AU apresenta uma ampla atividade terapêutica com potencial antibiótico, antitumoral, antituberculostático, antiviral, antiinflamatório, analgésico, antipirético, antimetabólico, antimicótico, antiproliferativo, antifúngico, antiprotozoário e anti-histamínico. Atua, ainda, como promissor agente quimioterápico, no tratamento e prevenção de placa dentária, como fotoprotetor de irradiações ultravioleta. (CAVIGLIA et al., 2001; COCCHIETTO et al., 2002; FRANCOLINI et al., 2004; INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Uma revisão recente sobre as atividades biológicas do AU e seus derivados é apresentada por Luzina e Salakhutdinov (2016).

A principal atividade biológica do AU é a sua atividade antibiótica, mostrada na década de 50 e ampliada por inúmeras investigações posteriores (COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002). Elo et al. (2007) demonstraram que diferentes concentrações de AU possuem alta atividade frente a sete cepas de microrganismos resistentes, tais como *Enterococcus* e *Staphylococcus*, quando comparado com a ampicilina, droga de referência, mostrando o potencial valor clínico deste metabólito.

A atividade anti-inflamatória foi demonstrada por Vijayakumar e colaboradores (2000) em um estudo de edema de pata em ratos Wistar, revelando uma significativa redução do edema, utilizando uma dose de AU de 100 mg/Kg de peso corpóreo, quando comparado com o ibuprofeno (na mesma dose), fármaco padrão de referência como antiinflamatório.

Sokolov et al. (2012) mostraram atividade antiviral e citotóxica do AU e de 11 derivados contra o vírus da pandemia da gripe A (H1N1), em que o isômero (-) do AU demonstrou ser mais ativo em comparação ao isômero (+). Já efeitos citopáticos dos herpes vírus simples tipo I foram inibidos *in vitro* quando células de rins de macacos infectados foram tratadas com (+)-ácido úsnico (PERRY et al., 1999).

Em estudo da atividade antitumoral do AU frente a linhagem celular de carcinoma de pulmão humano (NCI-H 292), observou-se que o AU em suspensão, e contido dentro de nanocápsulas poliméricas, exibiram atividade citotóxica (SANTOS et. al., 2006). Da mesma forma, Ribeiro-Costa et al. (2006) demonstraram redução de 43% de tumor por meio da administração de AU na região intraperitoneal em camundongos.

Em linhagens de células humanas T47D (câncer de mama) e Capan-2 (câncer pancreático), o AU apresentou um efeito inibitório sobre o crescimento e a proliferação das duas linhagens, com alteração do potencial de membrana mitocondrial (EINARSDÓTTIR et al., 2010); e citotoxicidade seletiva, refletindo atividade anticancerígena específica, em células neoplásicas de fígado (HepG2), quando comparado com células normais (NGUYEN, 2014).

Além disso, foi mostrado que o AU tem efeito apoptótico em linhagens de câncer humano, reduzindo significativamente a viabilidade celular e induzindo a apoptose em carcinoma de ovário, adenocarcinoma cervical, de mama, de cólon, leucemia promielocítica e leucemia de células T

(BACKOROVÁ et al., 2011; BE'ZIVIN et al., 2004; BURLANDO et al., 2009; EINARSDOTTIR et al., 2010; REN et al., 2009). E ainda, apresenta potencial na inibição de metástase, podendo ser usado para terapia com distintos mecanismos de ação (YANG et al., 2016).

Os efeitos deletérios do AU em células de mamíferos têm sido relatados por meio da inibição da proliferação celular e citotoxicidade em cultura de queratinócitos (KUMAR; MULLER, 1999), e em hepatócitos isolados de ratos tratados com diferentes concentrações, apresentando quase 100% de necrose com uma redução considerável dos níveis de ATP (HAN et al., 2004).

Estudos de Pramyothin et al. (2004) e Yokouchi et al. (2015) também demonstraram que o AU pode induzir toxicidade em hepatócitos e em células do miocárdio de ratos. Os mecanismos que determinam a toxicidade estão relacionados com a capacidade do AU induzir aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), provocando a perda de integridade da membrana, assim como de outras estruturas celulares, resultando na destruição da respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa.

Ação pró-oxidante e antioxidante, também são atribuídas ao AU (KOHLHARDT-FLOEHR et al., 2010). Isso se deve ao fato deste metabólito ser caracterizado como composto fenólico, que pode ajudar a combater o estresse oxidativo atuando como antioxidante, e ao mesmo tempo atuar no desequilíbrio do estado redox celular no sentido pró-oxidante, dependendo das condições específicas, ou seja, ambiente celular e quantidade do composto (HALLIWELL, 2008).

Apesar de o AU apresentar propriedades biológicas promissoras, sua utilização na terapêutica humana é limitada, uma vez que o seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado.

Estudos prévios têm demonstrado que enantiômeros do AU possuem efeitos genotóxicos *in vitro* em linfócitos do sangue periférico humano (PROKOPIEV et al., 2017), em células V79 e de camundongo Swiss (por meio dos testes cometa e de micronúcleos) (LEANDRO et al., 2013); reduzem toxicidade e aumentam a atividade antitumoral da bleomicina em camundontos (SU et al., 2017); possuem efeitos teratogênicos durante organogênese em ratas (SILVA et al., 2017). Desta forma, novos estudos são necessários para que seus efeitos biológicos, assim como os possíveis potenciais tóxico,

mutagênico / antimutagênico, recombinogênico / antirecombinogênico, carcinogênico / anticarcinogênico, clastogênico / anticlastogênico sejam elucidados.

### **3. Drosophotoxicologia**

Para a avaliação dos efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos de substâncias químicas, físicas ou biológicas podem ser utilizados diferentes organismos como modelo experimental (FONSECA; PEREIRA, 2004). A espécie *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como “mosca da fruta”, é um versátil organismo teste usado em pesquisas científicas nos campos da Genética, Biomedicina, Medicina, Ecotoxicologia e Biologia de Comportamento, responsáveis por fornecer importantes informações em estudos genéticos e de desenvolvimento (KIM et al., 2011).

A Drosophotoxicologia engloba a plethora de abordagens metodológicas relacionadas ao uso da *D. melanogaster* como organismo de escolha em estudos de toxicologia, por oferecer várias vantagens importantes, tais como estrutura de genoma relativamente simples, ciclo de vida curto, baixo custo de manutenção, simplicidade de manipulação experimental quando comparado aos modelos de vertebrados, tanto do ponto de vista ético como técnico, homologia de genes relevantes com organismos superiores, facilidade de obtenção de fenótipos mutantes, sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, rapidez e confiabilidade dos testes (LOMBARDOT et al., 2015; CHIFIRIUC et al., 2016). Além disso, a *Drosophila* é um organismo genético bem estudado para o entendimento dos mecanismos moleculares de doenças humanas. Aproximadamente 75% de genes causadores de doenças em humanos possuem homólogos funcionais na *Drosophila* (PANDEY; NICHOLS, 2011).

### **4. Teste para detecção de mutação e recombinação somática**

O teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART) desenvolvido por Graf et al. (1984) permite detectar um amplo espectro de eventos mutagênicos utilizando a *D.*



*melanogaster* como organismo teste. O teste baseia-se no fato de que durante o início do desenvolvimento embrionário da *Drosophila*, grupos de células proliferam mitoticamente até se diferenciarem em estruturas do corpo da mosca adulta. Se ocorrer uma alteração genética em uma célula do disco imaginal, esta alteração formará um clone de células mutantes que será detectado como uma mancha de pelos mutantes nas asas da mosca adulta (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995). A análise dessas manchas demonstra fenotipicamente a ação dos genes marcadores *flr<sup>3</sup>* ou *mwh*, responsáveis por mudanças na forma dos pelos ou tricomas (GRAF et al., 1984).

O SMART é considerado um teste rápido, barato, e que produz resultados confiáveis e altamente reproduzíveis (GRAF et al., 1984; SPANÓ et al., 2001). Tem se destacado como um instrumento preciso para discriminar simultaneamente agentes mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos. Além disso, pode ser utilizado para detecção de um amplo espectro de agentes genotóxicos de diferentes classes químicas, misturas complexas, assim como partículas aéreas (AMARAL, 2001; SARIKAYA et al., 2016; REIS et al., 2016; MORAIS et al., 2016; FERNANDES et al., 2017).

#### **4.1. Linhagens Mutantes de *D. melanogaster***

Para a realização do SMART são utilizadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster* com os marcadores genéticos multiple wing hairs (*mwh*, 3-0,3) e flare-3 (*flr<sup>3</sup>*, 3-38,0): (1) multiple wing hairs (*mwh/mwh*); (2) flare-3 (*flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup>sep l(3)89Aa bx34<sup>e</sup> and Bd<sup>S</sup>*); e (3) ORR; flare-3 (*ORR/ORR; flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup>sep l(3)89Aa bx34<sup>e</sup> and Bd<sup>S</sup>*). A linhagem ORR tem os cromossomos 1 e 2 de uma linhagem DDT-resistente Oregon R(R), responsáveis por altos níveis constitutivos de enzima citocromo P-450, o que torna o teste SMART mais sensível à ativação de promutágenos via citocromo (GRAF; VAN SCHAİK, 1992).

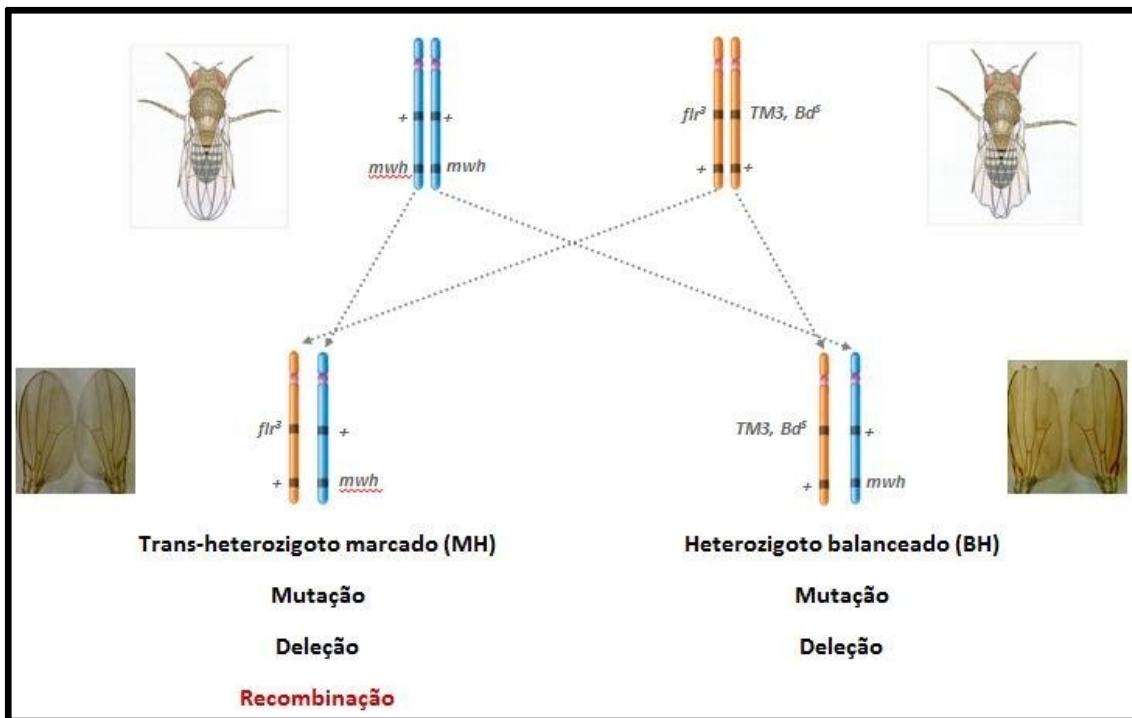
#### **4.2. Cruzamentos**

O teste SMART é realizado por meio de dois tipos de cruzamentos experimentais: 1] Cruzamento Padrão (Standard Cross – ST), que consiste em

fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>/In (3LR) TM3, ri p<sup>p</sup> sep I (3) 89Aabx<sup>34e</sup>* e *Bd<sup>s</sup>* cruzadas com machos *mwh* (GRAF et al., 1989); e 2] Cruzamento de alta bioativação (High Bioactivation Cross – HB), que consiste de fêmeas virgens *ORR; flr<sup>3</sup>/In (3LR) TM3, ri p<sup>p</sup> sep I (3) 89Aabx<sup>34e</sup>* cruzadas com machos *mwh* (GRAF; VAN SCHAİK, 1992).

A partir desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: trans heterozigotos marcados (marker trans-heterozygous - MH) e heterozigotos balanceados (balancer-heterozygous - BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente com base no marcador *TM3, Bd<sup>s</sup>*. Os descendentes MH desenvolvem asa normal, com borda lisa, enquanto que no BH as asas possuem aparência picotada ou serrilhada, denominadas serrilhadas (*serrate*) (**Figura 4**) (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995).

Os descendentes MH (*mwh+/+flr<sup>3</sup>*) apresentam os cromossomos estruturalmente normais, enquanto que os descendentes BH (*mwh+/+TM3,Bd<sup>s</sup>*) apresentam um cromossomo balanceador gênico com múltiplas inversões (*TM3, Bd<sup>s</sup>*). Os indivíduos MH expressam pelos mutantes nas asas originados por mutações e recombinações ocorridas nos loci gênicos *mwh* e *flr<sup>3</sup>*. Já os descendentes BH possuem um cromossomo balanceador *TM3/Bd<sup>s</sup>* que inviabiliza a recombinação gênica, permitindo apenas a detecção de eventos mutagênicos. Portanto, para que se tenha a taxa exata de recombinação e mutação a análise dos descendentes BH é de fundamental importância (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995).



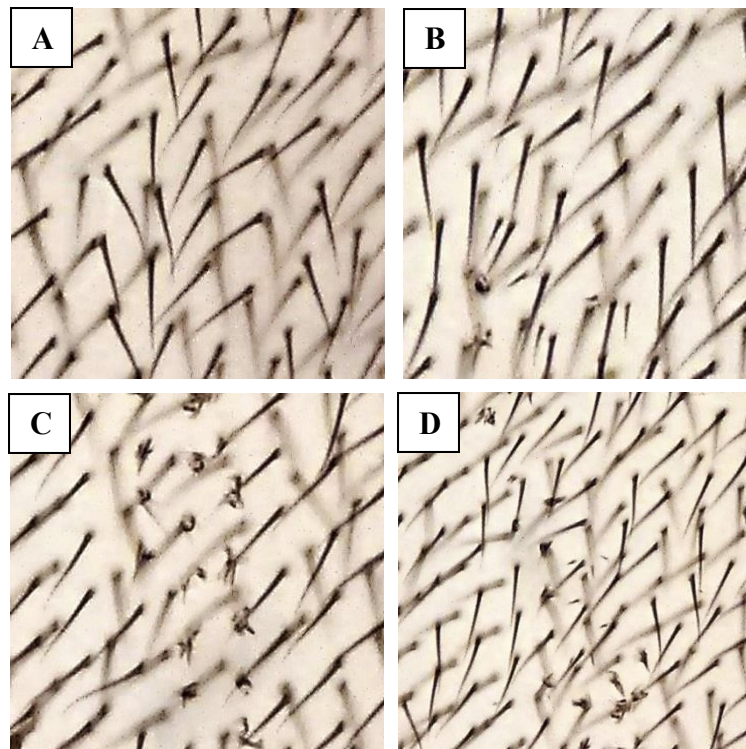
**Figura 4.** Representação esquemática dos cruzamentos realizados com as linhagens de *D. melanogaster*. Aspectos fenotípicos dos descendentes gerados e eventos genéticos identificados (Fonte: REZENDE, 2012).

### 4.3. Alterações genéticas diagnosticadas por meio da análise das asas

O teste SMART baseia-se no fato de que, se ocorrer alguma alteração genética nas células dos discos imaginiais de asa, que estão se dividindo por mitose, estas alterações estarão presentes em todas as células descendentes, induzindo o aparecimento de clones de células mutantes. (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

Pelos mutantes são, a partir daí, classificados em manchas: simples, quando expressam apenas um dos marcadores *mwh* ou *flr<sup>3</sup>*, originadas por mutação, aberração cromossômica (deleção) ou recombinação distal (**Fig. 5A**); gêmeas, quando expressam os dois marcadores *mwh* e *flr<sup>3</sup>* na mesma mancha (**Fig. 5B**). As manchas são ainda classificadas quanto ao tamanho, podendo

ser simples pequenas, quando possuir um ou dois pelos mutantes, ou simples grandes, se houver mais de dois pelos mutantes.



**Figura 5.** Fotomicrografia de clones de pelos mutantes em células de asas de *D. melanogaster*, obtidas em microscópio óptico de luz (aumento: 40X): **A.** Pelos normais **B.** Mancha simples, com pelos múltiplos (mwh); **C.** Mancha simples, com pelos flare ( $flr^3$ ); **D.** Mancha gêmea, com pelos múltiplos da asa e pelos flare (Fonte: Arquivo do Laboratório de Mutagênese, UFU).

## 5. Teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *D. melanogaster*

O Teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila* é considerado um teste rápido, barato, e que produz resultados confiáveis e altamente reproduzíveis (NEPOMUCENO, 2015). Tem sido utilizado para detecção de um amplo espectro de agentes carcinogênicos/anticarcinogênicos de diferentes classes químicas e misturas complexas (ORSOLIN et al., 2012; NEPOMUCENO, 2015; MORAIS et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2017).

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *D. melanogaster* e mamíferos tem estimulado os estudos relacionados à indução e o desenvolvimento de tumores em *D. melanogaster*, estudos estes que podem contribuir diretamente para o entendimento da gênese de cânceres em seres humanos (EEKEN, 2002).

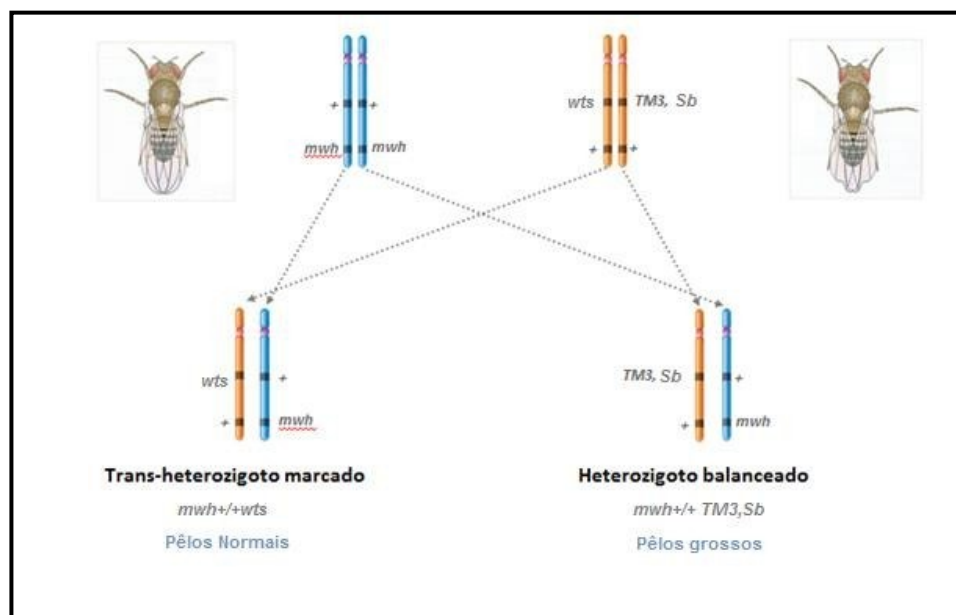
As células dos discos imaginiais de *Drosophila* possuem um ciclo celular muito semelhante ao das células de mamíferos. Os dados relativos a fatores que induzem tumores nessas células podem se relacionar diretamente com o risco desses fatores para induzir câncer em humanos. Um dos genes envolvidos na regulação do controle do ciclo celular é *wts* (verrugas), o homólogo de *Drosophila* do gene supressor de tumor quinase 1 serina/treonina dependente de fosforilação de mamífero *LATS1*. As mutações de *Drosophila wts* são recessivas letais. No entanto, os clones homozigotos que surgem nas moscas heterozigóticas nas células do disco imaginal levam a tumores epiteliais, crescimentos visíveis na cutícula do adulto. As proteínas quinases e CDK (quinase dependente de ciclinas) formam um complexo responsável pelo controle da regulação do ciclo celular em *D. melanogaster*. Participam desse controle diversos oncogenes e genes supressores de tumor (EEKEN et al., 2002).

O gene *wts* codifica uma proteína denominada serina/treonina quinase, importante na progressão do ciclo celular, especificamente na mitose (NISHIYAMA, 1999). O marcador *wts* está localizado no cromossomo 3 da mosca e é letal para o zigoto quando expresso em homozigose. Devido à letalidade, o alelo *warts* é mantido na linhagem estoque com a presença de um

balanceador cromossômico (TM3). Se ocorrer a perda da heterozigose nas células do disco imaginal, haverá formação de clones homozigotos, o que é viável em conjuntos de células isoladas da larva, que se manifestam como tumores na mosca adulta (SIDOROV et al., 2001).

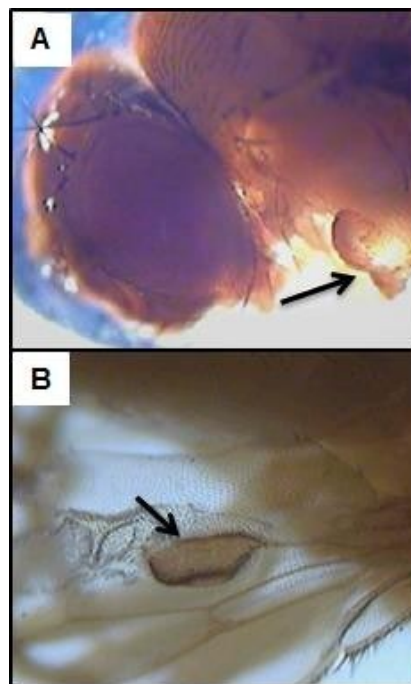
### 5.1. Cruzamento e Análise

O teste para detecção de tumor epitelial (*warts*) é realizado por meio de machos da linhagem *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*), com constituição genética  $Y; mwh JV (3-0,3)$  cruzados com fêmeas virgens da linhagem *warts* (*wts/TM3, sb<sup>1</sup>*), com constituição genética  $ST [1] in [1] kni[ri-1] wts[3-17]/TM3, sb^1$ . Deste cruzamento são obtidas dois tipos de descendentes: 1] Descendentes trans-heterozigotos marcados (*wts + / + mwh*); 2] Descendentes heterozigotos balanceados (*TM3, sb<sup>1</sup> + / + mwh*) (Figura 6).



**Figura 6.** Representação esquemática do cruzamento entre as linhagens *multiple wing hairs* e a linhagem *warts*, e seus descendentes (Fonte: Adaptado de REZENDE, 2012; MORAES, 2015).

Os descendentes trans-heterozigotos (portadores do genótipo *wts + / + mhw*), são separados e identificados pela presença de pelos selvagens (longos e finos). Os descendentes heterozigotos balanceados (que apresentam pelos curtos e grossos) são descartados, uma vez que não possuem o gene em estudo. Portanto, nos indivíduos trans-heterozigotos marcados os tumores podem se manifestar como clones de células circulares e extremamente invasivas, chamadas de verrugas, que se desenvolvem praticamente em todo o corpo da mosca: cabeça, olhos, corpo (tórax e abdômem), pernas, asas e halteres (**Figura 7**).



**Figura. 7.** Tumores em tecido epitelial de *D. melanogaster* (setas) observados em microscópio estereoscópico: A. Tumor no tórax: B Tumor na asa (Fonte: Arquivo do Laboratório de Citogenética e Mutagênese do UNIPAM, Patos de Minas, MG).

## 6. Ensaio de Focos de criptas aberrantes

Danos no material genético tendem a ser reparados por enzimas de reparo. No entanto, se a célula se dividir antes que o reparo ocorra, este dano pode levar ao aparecimento de uma alteração permanente no DNA. Os danos fixados são cumulativos e, após 11 eventos alterativos, a célula torna-se cancerosa e tem-se o início do processo da carcinogênese. Estes eventos são marcas de características que constituem um princípio organizador para racionalizar a complexidade da doença neoplásica (HANAHAN E WEINBERG, 2011). A carcinogênese é, então, o processo de transformação de uma célula normal em célula cancerosa, sendo que as substâncias responsáveis por esta transformação se designam agentes carcinogênicos. Estas alterações celulares produzem-se de forma cumulativa e continuada durante um largo período de tempo, geralmente durante anos (HAINAUT; PLYMOTH, 2013).

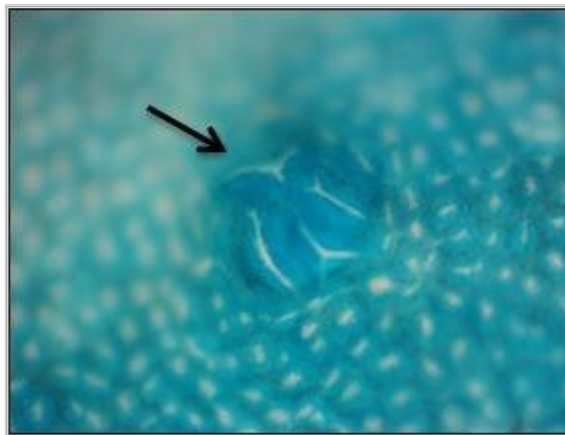
Considerando de crucial importância a utilização de estudos *in vivo* destinados a identificar os mecanismos envolvidos no efeito de substâncias genotóxicas e agentes carcinogênicos, ou prever o potencial quimiopreventivo em mamíferos, a química farmacêutica tem tentado associar os achados de ensaios de toxicologia genética a de testes de carcinogenicidade em roedores (SNYDER; GREEN, 2001).

Focos de cripta aberrantes (FCAs) são pequenas lesões densamente coradas com azul de metileno, identificáveis sob colonoscopia de aumento. O ensaio de FCAs tem sido relatado como um marcador de substituição ideal para quantificar o risco de câncer colorretal (CCR) e para avaliar os agentes quimiopreventivos (BURLAMAQUI et al., 2010; KAGEMOTO et al., 2017), uma vez que a quimioprevenção tornou-se uma área importante na pesquisa do câncer, devido à baixa taxa de sucesso das atuais modalidades terapêuticas (SAKI et al., 2017)

O ensaio de focos de criptas aberrantes (FCA) em ratos, foi descrito pela primeira vez por Bird (1987), e permite detectar lesões caracterizadas morfológicamente por criptas anormais na superfície da mucosa do cólon de ratos, coradas com azul de metileno. É amplamente aceito que os FCA são lesões precursoras do câncer colorretal (CCR) devido às suas características morfológicas, histológicas, biológicas e genéticas (CIDRI, 2012).



Os FCA localizam-se com maior frequência no cólon distal e constituem um grupo heterogêneo de lesões que vão desde modificações hiperplásicas, até modificações displásicas. São identificados e definidos pela sua aparência microscópica na mucosa do cólon, onde as criptas apresentam um tamanho maior do que o normal; apresentam uma camada mais grossa de células epiteliais do que as criptas normais, e tendem a ocorrer isoladamente, em pares ou em pequenos aglomerados. Os focos podem ser arredondados, fusiformes ou côncavos (**Figura 8**). Apesar das criptas poderem ser identificadas muito facilmente, sem muito treinamento em citologia, é importante enfatizar que só as lesões que são identificadas microscopicamente na mucosa intacta, e que reúnem os critérios anteriormente descritos, é que são consideradas FCA (Bird, 1987; CIDRI, 2011; 2012).



**Figura 8.** Fotomicrografia de foco de criptas aberrantes (Quatro criptas) em cólon de ratos Wistar (coloração: Azul de metileno; aumento: 100x). (Fonte: Laboratório de Mutagênese - UNIFRAM, Franca – SP).

A ocorrência espontânea de FCA em ratos tem uma frequência baixa (TANAKAMARU et al., 2001), mas existe uma clara associação entre o aumento do número de criptas isoladas ou múltiplas com alterações morfológicas após exposição à substâncias carcinogênicas (PAULSEN et al, 1996). Diferentes respostas ao carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH) são encontradas em diferentes linhagens de roedores, verificando-se a existência de linhagens mais resistentes e linhagens mais susceptíveis ao aparecimento de FCAs e posterior desenvolvimento de câncer de cólon, quando induzidos por este carcinógeno (ROSEMBERG ; LIU, 1995).

Não se conhecem os mecanismos da transformação de FCAs em neoplasias, mas sabe-se da existência de relação entre alterações de oncogenes e de mecanismos genéticos com a formação de FCAs. Mutações no gene K-ras e na proteína p53, envolvidos no desenvolvimento de câncer de cólon, estão associadas com o aumento do número de FCAs por campo e desenvolvimento de tumores por colônia (SHIVAPURKAR et al., 1997). Assim, a análise simples dos FCA na superfície da mucosa intestinal permite um conveniente estudo *in vivo* da influência de agentes quimioprotetores, e de outros parâmetros, como a inibição da proliferação celular e apoptose celular (MORI et al., 2004).

Os procedimentos para análise de FCA em cólon de ratos estão de acordo com a técnica descrita por Bird (1987). Os FCAs são caracterizados pelas alterações morfológicas diferenciais, sendo analisados 50 campos sequenciais do segmento distal do cólon, em microscopia de campo claro, em objetiva de 10X10. O número de FCAs é contado e realizado a multiplicidade de criptas.

Apesar dos FCAs serem considerados biomarcadores substitutos úteis para câncer colorretal humano (FUJII et al., 2017), a detecção de FCAs por coloração com azul de metileno e observação em microscópio óptico é muito laboriosa e demorada. Desta forma, novas metodologias despontam como promissoras no diagnóstico de FCAs por meio de endoscopia aprimorada por imagem, denominada de IEE [imagem de banda estreita (NBI) e imagem de laser azul (BLI)] (KAGEMOTO et al., 2017).

O ensaio de FCAs tem sido empregado para a avaliação e identificação de um grande número de agentes químicos com atividade

carcinogênica (MUNARI et al., 2014; CHEN et al., 2017; KAGEMOTO et al., 2017).

## **7. Teste do Micronúcleo**

Durante a divisão celular o material genético contido no núcleo replica e divide-se equitativamente pelas duas células-filhas recém formadas. Durante este processo, sobretudo na replicação e divisão do material genético, podem ocorrer erros, potenciados por agentes genotóxicos, que levam a danos cromossômicos. Desta forma, pode ocorrer separação desigual do material genético, e existir material genético que é excluído, ou não se incorpora corretamente no núcleo da célula filha, originando núcleos de menores dimensões, designados de micronúcleos (MNs) (FENECH, 2002).

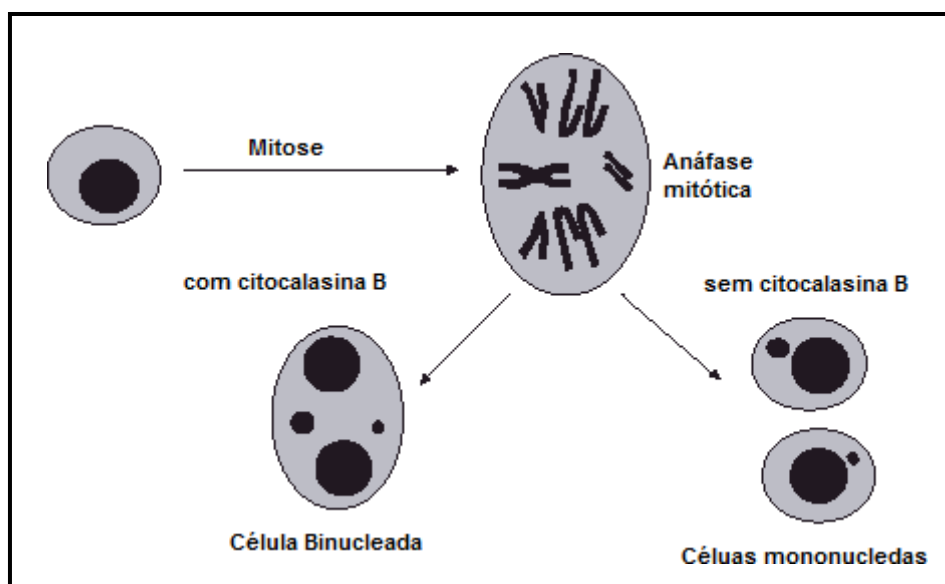
Os MNs são, portanto, corpos esféricos encontrados no citoplasma, com forma e coloração semelhante ao do núcleo principal. São originados de fragmentos acêntricos, cêntricos, ou cromossomos inteiros que podem se perderam durante a divisão nuclear. A perda de cromossomos inteiros pode se dar quando há alteração na formação do fuso mitótico (alterações nos centríolos, tubulina, microtúbulos) ou quando há alterações complexas na estrutura do cromossomo (centrômeros, cinetócoros), resultando em células filhas com um dos núcleos aneuplóide (FERNANDES et al., 2007).

O ensaio de micronúcleo é muito sensível, uma vez que permite detectar agentes que induzem quebras no DNA (agentes clastogênicos), e agentes que induzem a perda / não disjunção de cromossomos (agentes aneugênicos). Os agentes clastogênicos induzem a formação de micronúcleos por quebra da dupla hélice de DNA, formando-se fragmentos acêntricos incapazes de aderência às fibras do fuso mitótico e integração nos núcleos das células filhas. No caso de cromossomos inteiros com cinetócoros danificados, não podem ligar-se aos microtúbulos que puxam as cromátides para cada célula filha durante a mitose, permanecendo no exterior do novo núcleo formado. Estes danos podem ser provocados por agentes químicos que reagem com as proteínas constituintes dos cinetócoros (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001; SPEIT et al., 2007).

Agentes aneugênicos são químicos que impedem a formação do fuso mitótico. Estes agentes provocam a formação de células multinucleadas, em que cada núcleo contém um número diferente de cromossomos, bem como a exclusão de cromátides inteiras do núcleo da célula, formando MNs. (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA; 2001; SPEIT et al., 2007).

MNs e outras anomalias tais como pontes nucleoplasmáticas (*nucleoplasmic bridges – NPBs*) e botões nucleares (*nuclear buds – NBUDs*) são, portanto, biomarcadores de eventos genotóxicos e instabilidade cromossômica. Esses eventos, que levam a danos no genoma, podem ser avaliados *in vitro* por meio do Ensaio do Micronúcleo por Bloqueio da Citocinese (CBMN), também conhecido como *Cytokinesis-Block Micronucleus cytome (CBMNcyt) Assay*, que bloqueia o ciclo celular utilizando o bloqueio de citocinese com a citocalasina B. Desta forma são produzidas células binucleadas, permitindo um escore de MNs mais preciso, excluindo as células que se dividem das células que não se dividem. Isto é feito para melhorar a confiabilidade, reduzindo a incidência de dados falso-positivos (DEEPA-PARVATHI; RAJAGOPAL, 2014).

A citocalasina B é um inibidor da polimerização da proteína actina, requerida para a formação de anel de microfilamentos, que induz a contração do citoplasma e divisão da célula em duas células filhas (citocinese) (FENECH; CROTT, 2002; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). A análise dos MNs, após o bloqueio da citocinese pela citocalasina, fica restrita a células com aparência binucleada e evita subestimativas da frequência de MNs resultantes da contagem de células que não passaram por um ciclo de divisão e, conseqüentemente, não poderiam expressar estas estruturas (**Figura 9**). Assim, a metodologia possibilita a comparação da frequência de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir quanto a sua cinética de divisão e confere à técnica boa reprodutibilidade e confiabilidade, o que tem contribuído para a adoção do ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese como um importante teste citogenético (FENECH, 2007).



**Figura 9.** Esquema do bloqueio da citocinese com citocalasina B, induzindo a formação de células binucleadas; e sem citocalasina B, formando células mononucleadas (Fonte: ZALACAIN et al., 2005).

Para quantificação da frequência de MNs são analisadas apenas células binucleadas com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático, com membrana nuclear intacta, e células claramente distinguíveis do limite citoplasmático de células adjacentes. As células analisadas são classificadas de acordo com a quantidade de MNs: 0, 1, 2 ou mais (FENECH, 2000).

Para avaliar a citotoxicidade e o efeito citostático da substância testada, é calculado o índice de divisão nuclear (IDN), cálculo por meio da fórmula:

$$\text{IDN} = [ M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4) ] / N$$

Onde M1 - M4 representa os números de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos, respectivamente, e N o número total de células analisadas (EASTMOND; TUCKER, 1989; FENECH, 2000).

O CBMN tem sido amplamente usado para avaliar os efeitos clastogênicos e aneugênicos de diferentes agentes químicos *in vitro* (CANO et al., 2017; SILVA et al., 2017).

## 8. REFERÊNCIAS

Aasa, J.; Abramsson-Zetterberg, L.; Carlsson, H.; Törnqvist, M. The genotoxic potency of glycidol established from micronucleus frequency and hemoglobin adduct levels in mice. *Food Chem. Toxicol.*, v.100, p. 168-174, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.022>

Airaksinem, M.M., Peura, P., Antere, S. Toxicity of iceland lichen and reindeer lichen. *Arch. Toxicol.*, v. 9, p. 406-409, 1986.

Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B. Montanari, C.A., Donnici, C.L., Lopes, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova* v. 28, p. 118-129, 2005.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>

Amaral, V.S. Monitoramento do impacto de dejetos industriais em amostras de água do Rio Caí através do teste em *Drosophila melanogaster*. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, 74 p, 2001.

Andrade, H.H.R.; Lehmann, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: ULBRA, 2003. Cap. 11. p. 281-307.

Bačkorová, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Jendželovský, R.; Fedoročko, P. Variable response of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol. in vitro*, v. 25, p. 37- 44, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.004>

Barnes J. Pharmacognosy in the 21st century. *Pharm. J.*, v. 264, p. 701–703, 2000.

Bastaki, M.; Farrel, T.; Bhusari, S.; Pant, K.; Kulkarni, R. Lack of genotoxicity in vivo for food color additive Allura Red AC. *Food Chem. Toxicol.*, v. 105, p. 308-314, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.037>

Bazin, M.A., Lamer, A.C., Delcros, J.G., Rouaud, I., Boustie, P.U.J., Corbel, J.C., Tomasi, S. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 6860-6866, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.069>

Bézivin, C., Tomasi, S., Rouaud, I., Delcros, J.G., Boustie, J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convolute*. *Planta Med.*, v. 70, p. 874-881, 2004.  
<https://doi.org/10.1055/s-2004-827240>

Bird, R.P. Observation and qualification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.*, v. 37, p. 147-51, 1987.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3835\(87\)90157-1](https://doi.org/10.1016/0304-3835(87)90157-1)

BURLAMAQUI, I.M.B.; DORNELAS, A.C.; ESCALDANTE, D.R. MOTA, C.D.M.; MESQUITA, F.J.C.; CARVALHO, E.R.; VERAS, L.B.; RODRIGUES, L.V. Optimization of visibility and quantification of aberrante crypt foci in colonic mucosa in Wistar rats. *Acta Cir. Bras.* v. 25, On-line - ISSN 1678-2674, 2010.

Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F., Verotta, L. Antiproliferative effects on tumor cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Med.*, v. 75, p. 607-613, 2009.  
<https://doi.org/10.1055/s-0029-1185329>

Campanella, L., Delfini, M., Ercole, P., Iacoangeli, A., Risuleo, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. *Biochemistry*, v. 84, p. 329-334, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01386-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01386-X)

Cano, B.L.; Moreira, M.R.; Goulart, M.O.; Gonçalves, N.S.; Veneziani, R.C.S.; Bastos, J.K.; Ambrósio, S.R. Comparative study of the cytotoxicity and genotoxicity of kaurenoic acid and its semi-synthetic derivatives methoxy kaurenoic acid and kaurenol in CHO-K1 cells. *Food Chem. Toxicol.*, v.102, p.102-108, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.003>

Caviglia, A.M.; Nicora, P.; Giordani, P.; Brunialti, G.; Modenesi, P. Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (Lichenes), *Farmaco*, v. 56, p. 379-382, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01090-4](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01090-4)

Chen, H.P.; Pan, M.H.; Chou, Y.Y.; SUNG, .C; LEE, K.H.; LEUNG, C.M.; HSU, P.C. Effects of di(2-ethylhexyl)phthalate exposure on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumor promotion in rats. *Food Chem. Toxicol.*, v. 103, p. 157-167, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.014>

Chifiriuc, M.C.; Ratiu, A.C.; Popa, M.; Al, A. ECOVOIU. Drosophotoxicology: An emerging research area for assessing nanoparticles interaction with living organisms. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, p. 36, 2016.  
<https://doi.org/10.3390/ijms17020036>

Cidri, D.C.M. Análise computacional de imagens de focos de criptas aberrantes. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto. 2012.

Colchietto, M.; Skert, N.; Nimis, P.L.; Sava, G. A review on usnic acid an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, v. 89, p. 137-146, 2002.

<https://doi.org/10.1007/s00114-002-0305-3>

Costa, R.M.A.; Menck, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotec. Ci. Desenv.*, v. 3, p. 24-26, 2000.

Eastmond, D.A.; Tucher, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 13, p. 34-43, 1989.

<https://doi.org/10.1002/em.2850130104>

Eeken, J.; Klink, I.; Veen, B.; Pastink, A.; Ferro, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 40, p. 277-282, 2002.

<https://doi.org/10.1002/em.10119>

Einaradóttir, E., Groeneweg, J., Björnsdóttir, G.G., Harethardottir, G., Omarsdóttir, S., Ingólfssdóttir, K., Ogmundsdóttir, H.M., Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med.*, v. 76, p. 969-974, 2010.

<https://doi.org/10.1055/s-0029-1240851>

Elix J.A. Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH T. H. III (eds.): *Lichen biology*, 1st ed. Cambridge University Press, pp. 155–180, 1996.

Elo H.; Matikainen J.; Pelttari E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Naturwissenschaften*, v. 94, p. 465-468, 2007.

<https://doi.org/10.1007/s00114-006-0208-9>

Fenech, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov. Today*, v. 22, p. 1128-1137, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02502-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02502-3)

Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*, v. 2, p. 1084-1104, 2007.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>

Fenech, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, v. 455, p. 81-95, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

Fenech, M.; Crott, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient lymphocytes – evidence for breakage – fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.*, v. 504, p. 131-136, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00086-6)

Fenech, M.; Neville, S.; Rinaldi, J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 313, p. 203-207,



1993.

[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90050-7)

Fernandes, T.C.C.; Mazzeo, D.E.C.; Marin-Morales, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest. Biochem. Physiol.*, v. 88, p. 252–259, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>

FERNANDES, L.M.; GUTERRES, Z.R.; ALMEIDA, I.V.; VICENTINI, V.E.P. Genotoxicity and antigenotoxicity assessments of the flavonoid vitexin by the *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test. *J. Med. Food.* doi: 10.1089/jmf.2016.0149, 2017.

<https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0149>

Fonseca, C.; Pereira, D. Aplicação da Genética Toxicológica em plantas com atividade medicinal. *Infarma*, v. 16, 2004.

Francolini, I.; Norris, P.; Piozzi, A.; Donelli, G.; Stoodley, P. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrob. Agents Ch.*, v. 48, p. 4360-4365, 2004.

<https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4360-4365.2004>

Frölich, A.; Würgler, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, v. 216, p. 179-187, 1989.

[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(89\)90003-4](https://doi.org/10.1016/0165-1161(89)90003-4)

Fujii, T.; Sakai, E.; Takahashi, H. The distribution of human rectal aberrant crypt foci and criteria for defining the counting area. *Oncol. Lett.*, v. 13, p. 4501-4504, 2017

<https://doi.org/10.3892/ol.2017.6003>

Garcia, S.M.; Fernández, C.G. *Embriologia*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

Graf, U.; Frei, H.; Kagi, A.; Katz, A.J.; Würgler, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, v. 222, p. 359-373, 1989.

[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(89\)90112-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(89)90112-2)

Graf, U.; Van Schaik, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, v. 271, p. 59-67, 1992.

[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90032-H](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90032-H)

Graf, U.; Würgler, F.E.; Katz, A.J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C.B.; Kale, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, v. 6, p. 153-188, 1984.

<https://doi.org/10.1002/em.2860060206>

Hainaut, P.; Plymoth, A. Targeting the hallmarks of cancer: owards a rational approach to next-generation cancer therapy. *Cur. Opin. Oncol.*, v. 25, p. 50-51, 2013.

<https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835b651e>

Halliweell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidant? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biophys.*, v. 476, p. 107-112, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.028>

Han, D.; Matsumaru, K.; Rettori, D.; Kaplowitza, N. Usnic acid induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.*, v. 67, p. 439-451, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.09.032>

Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Halmarks of cancer. *Cell.*, v.144, p.646-674, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HIDALGO, M.E., FERNANDEZ, E., QUILHOT, W., LISSI, E. Antioxidant activity of depsides and depsidones. *J. Phytochem.*, v. 37, p. 585-1587, 1994.

[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89571-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89571-0)

HONDA, N.K.; VILEGAS, W.A. A química dos líquens. *Química Nova*, v.21, p.10-125, 1999.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000100018>

Howell, G.M.E.; Newton, E.M.; Williams-Wynn, D.D. Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. *J. Mol. Struct.*, v. 651, p. 27-57, 2003.

Ingólfssdóttir, K. Usnic acid. *Phytochemistry*, v. 61, p. 729 – 736, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)

Justice, R.W.; Zilian, O.; Woods, D.F.; Noll, M.; Bryant, P.J. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Gene Dev.*, v. 9, p. 534-546, 1995.

<https://doi.org/10.1101/gad.9.5.534>

Kagemoto, K.; Okamoto, K.; Takaoka, T.; Okada, Y.; Tanaka, K.; Hirao, A.; Kitamura, S.; Kimura, T.; Miyamoto, H.; Muguruma, N.; Okahisa, T.; Tsuneyama, K.; Takayama, T. Detection of aberrant crypt foci using image-enhanced endoscopy. *Gastrointest. Endosc.*, v. 85, p.B2522017, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.gie.2017.03.568>

Kim, S.I.; Jung, J.W.; Ahn, Y.J.; Restifo, L.L.; Kwon, H.W. *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. *J. Asian-Pacific Entomol.*, v.14, p. 509-517, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2011.07.001>

Kohlhardt-Floehr, C.; Boehm, F.; Troppens, S.; Lademann, J.; Truscott, T. G. Prooxidant and antioxidant behavior of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. *J. Photoch. Photobio. B: Biology*, v.101, p. 97-102, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.06.017>

Kristmundsdóttir, T.; Aradóttir, H.A.; Ingólfssdóttir, K.; Ogmundsdóttir, H.M. Solubilization of the

lichen metabolite (+) – usnic acid for testing in tissue culture. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 54, p. 1447-1452, 2002.

<https://doi.org/10.1211/002235702225>

Kumar, K.C.S.; Muller, K. Medicinal plants from Nepal: II. Evaluation as inhibitors of lipid peroxidation in biological membranes. *J. Ethnopharmacol.*, v. 64, p. 135-139, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00117-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00117-2)

Kuroda, Y.; Jain, A.K.; Tezuka, H.; Kada, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.*, v. 267, p. 201-209, 1992.

[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(92\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(92)90064-9)

Lombardot, B.; Oh, C.T.; Kwak, J.; Genovesio, A.; Kang, M.; Hansen, M.A.E; Han, S.-J. High-throughput in vivo genotoxicity testing: an automated readout system for the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). *PLoS ONE* 10(4): e0121287, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121287>

Lücking, R.; Dal-Forno, M.; Sikaroodi, M.; Gillevet, P.M.; Frank Bungartz, F.; Bibiana Moncada, B.; Yáñez-Ayabaca, A.; Chaves, J. L.; Coca, L.F.; Lawrey, J.D. A single macrolichen constitutes hundreds of unrecognized species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 29, p. 11091-11096, 2014.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1403517111>

Lutzoni, F.; Miadlikowska, J. *Lichens. Curr. Biol.*, v. 19, n.13. 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.034>

Luzina, O. A.; Salakhutdinov, N. F. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 1. Activity against unicellular organisms. *Russ. J. Bioorganic Chem.*, v. 42, p. 115-132, 2016.

<https://doi.org/10.1134/S1068162016020084>

Majer, B.J.; Laky, B.; Knasmüller, S.; Kassie, F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat. Res.*, v. 489, p. 147-172, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(01\)00068-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(01)00068-0)

Martins, M.C.B.; Lima, M.J.G.; Silva, F.P.; Azevedo-Ximenes, E.; Silva N.H. Pereira, E.C. *Cladia aggregata* (lichen) from brazilian northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 53, p. 115–122, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100015>

MARTINS, M.C.B.; SILVA, M.C.; SILVA, L.R.S.; LIMA, V.L.M.; PEREIRA, E.C.; FALCAO, E.P.S.; MELO, A.M.M.; SILVA, N.H. Usnic acid potassium salt: an alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *PLoS ONE*, v. 9: e111102, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111102>

Morais, C.R.; Bonetti, A.M.; Carvalho, S.M.; Rezende, A.A.A.; Araujo, G.R.; Spanó, M.A. Assessment of the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of fipronil insecticide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, v. 165, p.

342-351, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.023>

Morais, C.R.; Vieira, T.C.; Borges, R.M.; Guimarães, L.M.M.; Barcelos, L.A.; Souza, F.C.; Pimentel, L.S.; Silva, J.C.; Vasconcelos, M.A.; Rodrigues, T.S.; Sousa, F.A.; Rezende, A.A.A.; Spanó, M.A.; Bonetti, A.M. Assessment of carcinogenic potential of soft drinks of cola, diet cola, orange and lemon, produced in the city of Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil. *Biosci. J.*, v. 32, p. 1025-1039, 2016.

<https://doi.org/10.14393/BJ-v32n4a2016-32969>

Mori, H.; Yamada, Y.; Toshiya, K.; Yoshinobu, H. Aberrant crypt foci and  $\beta$ -catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. *Mutat. Res.*, v. 566, p. 191-208, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.08.002>

Munari, C.C.; De Oliveira, P.F.; Leandro, L.F.; Pimenta, L.M.; Ferreira, N.H.; Da Costa, J. DE C.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C. In vivo assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloidic extract. *PLoS One*. v. 9, e111999, 2014.

Nash, T.H. *Lichen Biology 2*. Cambridge University, New York. 2008.

<https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478>

NEPOMUCENO, J.C. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents through the test for detection of epithelial tumor clones (warts). *Adv. Tech. Biol. Med.* v. 3, p. 149.

Nguyen, T.T.; Yoon, S.; Yang, Y.; Lee, H.B.; Oh, S.; Jeong, M.H.; Kim, J.J.; Yee, S.T.; Crişan, F.; Moon, C.; LEE, K.Y.; KIM, K.K.; HUR, J.S.; KIM, H. Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. *PLoS One*. v.9: e111575, 2014.

Nimis, P.L.; Skert, N. Lichen chemistry and selective grazing by the coleopteran *Lasioderma serricorne*. *Environ. Exp. Bot.*, v. 55, p. 175–182, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.10.011>

Nishiyama, Y.; Hirota, T.; Morisaki, T.; Hara, T.; Marumoto, T.; Iida, S.; Makino, K.; Yamamoto, H.; Hiraoka, T.; Kitamura, N.; Saya, H. A human homolog of *Drosophila* warts tumor suppressor, h-swarts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *FEBS Lett.*, v. 459, p. 159-165, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01224-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01224-7)

Odabasoglu, F.; Cakir, A.; Suleyman, H.; Aslan, A.; Bayir, Y.; Halici, M.; Kazaz, C.J. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J. Ethnopharmacol.*, v. 103, p. 59-65, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.043>

Orsolin, P.C.; Silva-Oliveira, R.G.; Nepomuceno, J.C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* v. 50, p. 2598-2604, 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.008>

PANDEY, U.B.; NICHOLS, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.*, 63, 411e436, 2011.

Paulsen, J.E.; Steffensen, I.L.; Namork, E.; Hein, D.W.; Alexander, J. Effect of acetylator genotype on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl induced aberrant crypt foci in the colon of hamsters. *Carcinogenesis*, v. 17 p. 459-65, 1996.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/17.3.459>

Perry, N.B.; Benn, M.H.; Brennan, N.J.; Burgess, E.J.; Ellis, G.; Galloway, D.J. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenologist.*, v. 31, p. 627-636, 1999.  
<https://doi.org/10.1006/lich.1999.0241>

Pramyothin, P.; Janthasoot, W.; Pongnimitpraset, N.; Phrukudomc, S.; Ruangrunsi, N. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *J. Ethnopharmacol.*, v. 90, p. 381-387, 2004.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.10.019>

Prokopiev, I.A.; Filippov, E.V.; Filippova, G.V.; Gladkina, N.P. Genotoxicity of usnic-acid enantiomers in vitro in human peripheral-blood lymphocytes. *Cell Tissue Biol.*, v. 11, p. 141-146, 2017.  
<https://doi.org/10.1134/S1990519X17020031>

Ren, M.R.; Hur, J.S.; Kim, J.Y.; Park, K.W.; Park, S.C.; Seong, C.N. Anti-proliferative effects of *Lethariella zahlbruckneri* extracts in human HT-29 human colon cancer cells. *Food Chem. Toxicol.*, v. 47, p. 2157-2162, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.042>

Reis, É.M.; Rezende, A.A.A.; Oliveira, P.F.; Nicolella, H.D.; Tavares, D.C.; Silva, A.C.A.; Dantas, N.O.; Spanó, M.A. Evaluation of titanium dioxide nanocrystal-induced genotoxicity by the cytokinesis-block micronucleus assay and the *Drosophila* wing spot test. *Food Chem. Toxicol.*, v. 96, p. 309-319, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.023>

Rezende, A.A.A. Estudo comparativo dos efeitos moduladores da (-) - cubebina sobre a mutagenicidade/recombinogenicidade induzida por diferentes agentes químicos. Tese de Doutorado, Uberlândia, 127p. 2012.

Ribeiro-Costa, R.M.; Alves, A.J.; Santos, N.P.; Nascimento, S.C.; Gonçalves, E.C.; Silva, N.H.; Honda, N.K.; Santos-Magalhães, N.S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J. Microencapsul.*, v. 21, p. 371-384, 2004.

<https://doi.org/10.1080/02652040410001673919>

Rosemberg, D.W.; Liu, Y. Induction of aberrante crypts in murine colon with varying sensivity to colon carcinogenesis. *Cancer Lett.*, v.92, p.209-214, 1995.

[https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)03797-Z](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)03797-Z)

Salvadori, D.M.F.; Ribeiro, L.R.; Fenech, M. Teste do micronúcleo em células humanas. Em: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. MARQUES, E.K. *Mutagênese Ambiental. Canoas: Ulbra*, 2003, p.201-223.

Santos, N.P.; Nascimento, S.C.; Wanderley, M.S.O.; Pontes-Filho, N.T.; Silva, J.F.; Castro, C.M.M.B.; Pereira, E.C.; Silva, N.H.; Honda, N.K.; Santos-Magalhaes, N.S.

Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 64, p. 154-160, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.05.018>

Sarikaya, R.; Erciyas, K.; Kara, M.I.; Sezer, U.; Erciyas, A.F.; Ay, S. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of boron by the somatic mutation and recombination test (SMART) on *Drosophila*. *Drug Chem. Toxicol.*, v. 39, p. 400-406, 2016.

<https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1130719>

Serrano-Garcia, L.; Montero-Montoya, R. Micronuclei and chromatid buds are result of related genotoxic events. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 38, p. 38-45, 2001.

<https://doi.org/10.1002/em.1048>

Shang, X.; Miao, X.; Wang, D.; Zhang, J.; Yang, Z.; Pan, H. Acaricidal activity of usnic acid and sodium usnic acid against *Psoroptes cuniculi* in vitro. *Parasitol. Res.*, v.113, p. 2387-2390. 2014.

<https://doi.org/10.1007/s00436-014-3910-0>

Shivapurkar, N.; Huang, L.; Ruggeri, B.; Swalsky, P.A.; Backker, A.; Finkelstein, S.; Frost, A.; Silverberg, S. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett.*, v. 115, p.39-46, 1997.

[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)04709-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)04709-5)

Shrestha, G.; ST. Clair, L.L. Lichens: a promising source of antibiotic and anti-cancer drugs. *Phytochem. Rev.*, v.12, p. 229-244, 2013.

<https://doi.org/10.1007/s11101-013-9283-7>

Sidorov, R. A.; Ugnivenk, O. E. G.; Khovanova, E. M.; Belitsky, G. A. Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster* wts/wts+ heterozygotes with chemical carcinogenes. *Mutat. Res.*, v. 498, p. 181-191, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00277-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00277-7)

Silva, C.R.; Marinho, K.S.N.; Silva, T.D.S.; Ferreira, D.K.S.; Aguiar, G.M.; Martins, M.C.B.; Santos, K.R.P.; Aguiar Júnior, F.C.A.; Santos, N.P.S.; Pereira, E.C.; Silva, N.H. Teratogenic Effect of Usnic Acid from *Cladonia substellata* Vainio during Organogenesis. *Bio Med Res. Int.* Article ID 5948936, 2017.



Silva, I.C.; Polaquini, C.R.; Regasini, L.O.; Ferreira, H.; Pavan, F.R. Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. *Food Chem. Toxicol.* v. 105, p. 300-307, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.033>

Snyder, R.D.; Green, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutat Res.*, v. 488, p.151-169, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(01\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(01)00055-2)

Sokolov, D.N.; Zarubaev, V.V.; Shtro, A.A.; Polovinka, M.P.; Luzina, O.A.; Komarova, N.I.; Salakhutdinov, N.F.; Kiselev, O.I. Anti-viral activity of (-) and (+) - usnic acids and their derivatives against influenza virus A (H1N1) 2009. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 22, p. 7060-7064, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.084>

Speit, G.; Schmid, O.; Frohler-Keller, M.; Lang, I.; Triebig, G. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by de micronucleus test with exfoliated bucal mucosa cell, *Mutat. Res.*, v. 627, p. 129-131, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.10.013>

Su, Z.Q.; Liu, Y.H.; Guo, H.Z.; Sun, C.Y.; Xie, J.H.; Li, Y.C.; Chen, J.N.; Lai, X.P.; Su, Z.R.; Chen, H.M. Effect-enhancing and toxicity-reducing activity of usnic acid in ascitic tumor-bearing mice treated with bleomycin. *Int Immunopharmacol.*, v. 46, p.146-155, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.03.004>

Svensson, M.; Caruso, A.; Yahr, R.; Ellis, C.; Thor, G.; Snall, T. Combined observation and experimental data provide limited support for facilitation in lichens. *Oikos*, v. 125, p. 278-283, 2016.

<https://doi.org/10.1111/oik.02279>

Takani, M.; Yajima, T.; Masuda, H.; Yamauchi, O. Spectroscopic and structural characterization of copper (II) and palladium (II) complexes of a lichen substance: usnic acid and its derivatives. Possible forms of environmental metals retained in lichens. *J. Inorg. Biochem.*, v. 91, p. 139-150, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00439-7](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00439-7)

Tanakamaru, Z.; Mori, I.; Nishikawa, A.; Furukawa, F.; Takahashi, M.; Mori, H. Essential similarities between spontaneous and MeIQx-promoted aberrant crypt foci in the F344 rat colon. *Cancer Lett.*, v. 172, p. 143–149, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00636-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00636-X)

Tucher, J.D.; Preston, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutat. Res.*, v. 365, p. 147-159, 1996.

[https://doi.org/10.1016/S0165-1110\(96\)90018-4](https://doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90018-4)

Vasconcelos, M.A.; Orsolin, P.C.; Silva-Oliveira, R.G.; Nepomuceno, J.C.; Spanó, M.A. Assessment of the carcinogenic potential of high intense-sweeteners through the test for

detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.*, v. 101, p. 1-7, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.028>

Venkataramana, D.; Krishna, K. High-performance liquid chromatographic determination of usnic acid in plasma. *J. Chromatogr.*, v. 575, p. 167-170, 1992.

[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80520-Z](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80520-Z)

Vinjayakumar, C.S.; Viswanathan, S.; Reddy, M.K.; Parvathavarthini, S.; Kundu, A.B.; Sukumar, E. Anti-inflammatory activity of (+) – usnic acid. *Fitoterapia*, v. 71, p. 564-566, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00209-4](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00209-4)

Wei, X.; Jeon, H.S.; Han, K.S.; Koh, Y.J.H.J.S. Antifungal Activity of Lichen forming fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. *Plant Pathol. J.*, v. 24, p. 202–206, 2008.

<https://doi.org/10.5423/PPJ.2008.24.2.202>

Yang, Y.; Nguyen, T.T.; Jeong, M.; Crisan, F.; Yu, Y.H.; Ha, H.H.; Choi, H.K.; Jeong, G.H.; Jeong, C.T.; Lee, Y.K.; Kim, K.K.; Hur, S.J.; Kim, H. Inhibitory activity of (+)- usnic acid against non-small cell lung cancer cell motility. *Plos One* v. 11: e0146575, 2016.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146575>

Yokouchi, Y.; Imaoka, M.; Niino, N.; Kiyosawa, N.; Sayama, A.; JINDO, T. Usnic acid-induced myocardial toxicity in rats. *Toxicol. Pathol.*, v. 43, p. 424-434, 2015.

<https://doi.org/10.1177/0192623313504308>

Zalacain, M.; Sierras-Súmaga, L.; Patiño, A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Anales Sis San Navarra*, v.28, 2005.



---

---

# **CAPÍTULO II**

**Assessment of genotoxic, antigenotoxic and  
anticarcinogenic activities of (+)-usnic acid**

---

---

## **Assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of (+)-usnic acid**

Nayane Moreira Machado<sup>a</sup>, Arthur Barcelos Ribeiro<sup>b</sup>, Ana Paula Prado Guissone<sup>b</sup>, Francisco Rinaldi-Neto<sup>b</sup>, Heloiza Diniz Nicolella<sup>b</sup>, Igor Lizo Limonti Lemos<sup>b</sup>, Lucas Henrique Domingos da Silva<sup>b</sup>, Ricardo Andrade Furtado<sup>b</sup>, Saulo Duarte Ozelin<sup>b</sup>, Denise Crispim Tavares<sup>b</sup>, Alexandre Azenha Alves de Rezende<sup>a,c</sup>, Mário Antônio Spanó<sup>a\*</sup>

*<sup>a</sup>Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil*

*<sup>b</sup>Universidade de Franca, Franca, São Paulo, Brazil*

*<sup>c</sup>Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Ciências Integradas do Pontal. Ituiutaba, Minas Gerais, Brazil.*

\*Corresponding author. Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese. Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia – MG 38400-902, Brazil  
E-mail adress: [maspano@ufu.br](mailto:maspano@ufu.br) (M. A. Spanó)

**Highlights:**

- The genotoxic and modulatory activity of AU on doxorubicin-induced genotoxicity was studied in CHO cells in vitro.
- AU (30 µg / mL) induced a significant increase in the micronucleus frequency when compared to the negative control.
- The effect of UA on colorectal pre-neoplastic lesions previously induced by DMH was studied in Wistar rats in vivo.
- AU reduced the frequency of FCA and CA induced by DMH.
- The antioxidant and pro-oxidant properties of UA may be responsible for the observed results.

## **Abstract**

Unic acid (UA) is one of the most common and abundant lichen metabolites. UA possesses antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidative and antitumoral activities. The aim of this study was to investigate the cytotoxic, genotoxic and modulatory activity of UA on doxorubicin (DXR)-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells, using the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay, and the effects of UA on pre-neoplastic colorectal lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) using the aberrant crypt foci (ACF) as biomarker in rats. Male Wistar rats were treated with DMH (40 mg/kg b.w) twice a week for two weeks. UA was administered in dosages of 3.125; 12.5 and 50 mg/kg b.w. Ultrapure water (negative control), Tween 5% (solvent control), solvent control + DMH, and positive control (DMH 160 mg/kg b.w) groups were also included. The animals that received the different doses of UA in association with DMH demonstrated statistically significant reductions in the ACF and aberrant crypts (AC) values when compared to the group treated with DMH alone. In the CBMN assay, UA (7.5; 15 and 30  $\mu\text{g/mL}$ ) alone was examined for genotoxicity, and combined with DXR (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) for antigenotoxicity. Negative, solvent (DMSO, 0.3  $\mu\text{M}$ ) and positive (DXR 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) controls were also included. Cells treated with UA (30  $\mu\text{g/mL}$ ) induced significant increase in micronuclei frequency when compared to the negative control. The antioxidant and pro-oxidant properties of this compound are likely to account for the present results.

**Keywords:** 1,2-dimethylhydrazine; aberrant crypt foci; CBMN assay; genotoxicity; chemoprevention.

## 1. Introduction

Lichens are symbiotic organisms composed of fungi and algae, that produce phenolic compounds that can be used for pharmaceutical purposes, including anti-tumoral activities. Among them, usnic acid (UA) seems to be one the most promising, although its impact on the invasive potential of tumor cells have not yet been fully understood (Martins et al., 2014; Polat et al., 2016; Yang et al., 2016; Galanty et al., 2017).

UA is a dibenzofuran derivative, resulting from lichen secondary metabolism, existing in nature as two enantiomeric forms: (+) and (-)-usnic acid, depending on the position of the chiral carbon methyl group 9B. UA has been isolated from various lichen genera, such as *Alectoria*, *Cladonia*, *Evernia*, *Flavocetraria*, *Lecanora*, *Ramalina* and *Usnea* (Ingólfssdóttir, 2002; Suwalsky et al., 2015; Yang et al., 2016; Silva et al., 2017a). Previous studies demonstrated that UA and its derivatives have different biological activities, such as: anti-angiogenic, anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, antiproliferative, antitumoral, and cytotoxic (Chen et al., 2014; Fernández-Moriano et al., 2017; Koparal, 2015; Mayer et al., 2005; Prokopiev et al., 2017; Ribeiro-Costa et al., 2004; Su et al., 2017; Suwalsky et al., 2015; Thadhani and Karunaratne, 2017; Yang et al., 2016; Yu et al., 2016). A review of the biological properties and toxicity of UA is presented by Araújo et al. (2015).

UA showed cytotoxic activity against several cancer cell lines, such as wild-type p53 breast cancer cell line MCF7, as well as the non-functional p53 breast cancer cell line MDA-MB-231 and the lung cancer cell line H1299 (null for p53). Like this, the anti-cancer property of UA, that work in a p53-independent manner, makes it a potential candidate for novel cancer therapy (Mayer et al., 2005). UA also showed cytotoxicity against cell lines HT29 (colon cancer), AGS (gastric cancer), A549 (lung cancer), and CWR22Rv-1 (prostate cancer)( Nguyen, et al., 2014); significant inhibitory activity against motility of human lung cancer cells (Yang et al., 2016); selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate cancers DU-145 and PC-3 cells and melanoma HTB-140 cells (Galanty et al., 2017).

Nguyen et al. (2014) proposed a rationale for combined using of additional compounds such as UA to improve responses to anti-cancer therapy in patients resistant to routine cancer chemotherapy. Recently, UA showed an

effect-enhancing and toxicity-reducing in ascit tumor on H22-bearing Kunming mice treated with bleomycin (Su et al., 2017).

However, there are limited data on the mutagenic/antimutagenic, genotoxic/antigenotoxic properties of UA, and the obtained results are often contradictory.

Aberrant crypt foci (ACF) in the colons of mice and rats exposed to carcinogens, such as 1,2-dimethylhydrazine (DMH), can easily be visualized in the unsectioned methylene blue-stained colons under light microscopy, where they are distinguished by their increased size, more prominent epithelial cells, and pericryptal space (Bird 1987; Tudek et al., 1989). Thus, the ACF test has been used as a short-term bioassay to assess the role of chemopreventive agents in colorectal carcinogenesis (Munari et al., 2014; Chen et al., 2017; Kagemoto et al., 2017; Alves et al., 2017).

Micronuclei (MN) are derived from chromosome breakage and/or whole chromosome loss retained during cell division, in anaphase. The MN can be evaluated by the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay, considered to be the method of choice for analyzing DNA damage, cytostasis, and cytotoxicity. In this assay, DNA damage events are scored specifically in once-divided binucleated (BN) cells, allowing a more accurate MN score and excluding the dividing cells from the non-dividing cells to enhance the reliability by reducing the incidence of false positive data (Fenech, 2007; Deepa Parvathi and Rajagopal, 2014; Silva et al., 2017b). The micronucleus test (MNT) has been used to evaluate clastogenic and aneugenic effects of different chemical substances, including phenolic compounds (Alves et al., 2017; Silva et al., 2017b).

The aim of this study was the assessment of anticarcinogenic, genotoxic, antigenotoxic activities of (+)-usnic acid using, respectively, the aberrant crypt foci (ACF) and the CBMN assays.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. (+) – Usnic acid**

(+)-usnic acid (UA), 2,6-Diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b, dimethyldibenzo [*b,d*]furan-1,3(2*H*,9*bH*)-dione, (CAS # 7562-61-0) (Figure 1) was kindly provided

by Denise Crispim Tavares PhD, of the Natural Products Research Group of the University of Franca (UNIFRAN), Franca, SP, Brazil.

## **2.2. Aberrant crypt foci (ACF) assay**

### **2.2.1. Animals**

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), weighing approximately 120 g were provided by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. The animals were housed in plastic boxes in an experimental room under controlled conditions of temperature ( $22 \pm 2$  °C) and humidity ( $50 \pm 10\%$ ) under a 12 hours light-dark cycle, with standard rat chow and water available *ad libitum*. The study was conducted in accordance with internationally accepted principles for use and care of laboratory animals, in accordance with US guidelines (NIH # 85-23, revised 1985). The study protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Care of the University of Franca (N ° 1574270916).

### **2.2.2. ACF-inducing agents**

The colon carcinogen 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) (CAS 540-73-8), (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) was dissolved immediately prior to use in 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (CAS 60-00-4), (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Male Wistar rats were given subcutaneous injections of DMH (total dose of 160 mg / kg b.w.) divided into four subcutaneous injections of 40 mg / kg b.w., which were administered twice a week for two weeks (weeks 2 and 3), and submitted to euthanasia at the end of the 5<sup>th</sup> week, as described by Senedese et al. (2013).

### **2.2.3. Experimental procedure**

To perform the experimental procedure, 7 groups of male Wistar rats (5 animals for each group) were acclimatized for 1 week and then treated with DMH (40 mg / kg b.w) alone, twice a week for two weeks, or combined with UA, which was administered during 5 days of the week, in different doses (3.125; 12.5 or 50 mg / kg b.w) (Figure 2). Ultrapure water (negative control), Tween 5% (solvent control), solvent control + DMH, and positive control (DMH 160 mg / kg b.w) groups were also included.

AU doses were selected based on preliminary tests. Body weight and water consumption were measured daily throughout the experimental period after the first treatment with DMH. The period of 4 weeks of treatment was considered to be sufficient to observe formation of ACF according to previous studies of Bazo et al. (2002) and Rodrigues et al. (2002).

#### **2.2.4. ACF analysis**

Procedures for analysis of FCA in rat colon were performed according to Bird (1987). The animals were anesthetized with 1 mL of 1% thiopental sodium (500 mg / kg b.w.) and euthanized by exsanguination. After laparoscopy, the distal colon was excised, flushed with tap water to remove the faeces, opened longitudinally and fixed in 10% formaldehyde solution for 24 hours.

For histological analysis the colon was stained with 0.02% methylene blue for 15 minutes and mounted on a microscopic slide with the mucosa facing upwards, allowing the identification and quantification of the FCA.

The FCAs were characterized by differential morphological alterations proposed by Bird (1987). Fifty sequential fields of the distal colon were analyzed in light microscopy at a magnification of 100 x. The number of crypts and the multiplicity of crypts (number of crypts per ACF) were recorded. Each colon was examined by at least three observers in a double-blind manner.

#### **2.2.5. Statistical analysis**

The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) for fully randomized experiments, with calculation of F statistics and respective P values. In cases in which  $P < 0.05$ , treatment means were compared by the Tukey test and the minimum significant difference was calculated for  $P = 0.05$ . Statistical analysis was performed using the Graph Pad Prism program 5.

### **2.3. Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay**

#### **2.3.1. Cells and culture conditions**

The Chinese hamster ovary (CHO) cell lines were maintained as monolayers in plastic culture flasks (25 cm<sup>2</sup>) in HAM-F10 (Sigma-Aldrich) and DMEM (Sigma-Aldrich) (1:1) culture medium, supplemented with 10% fetal



bovine serum (Nutricell), antibiotics (0.01 mg / mL streptomycin and 0.005 mg/mL penicillin, Sigma-Aldrich) and 2.32 mg / mL Hepes (Sigma-Aldrich) incubated at 37 °C in a BOD-type incubator. Under these conditions, the cell cycle time was 12 hours, and the experiments were carried out using CHO cells after the 4th passage. The protocols used in this study were performed in triplicate.

### **2.3.2. DNA - inducing agent**

To study the modulating effect of AU on chromosomal aberration, doxorubicin (DXR, Eurofarma Laboratories Ltda.) was dissolved in sterile distilled water and used at a concentration of 0.5 µg / mL. DXR is one of the antineoplastic agents belonging to the anthracycline class that has a broad spectrum of clinical activity against neoplasms, being a free radical generator and topoisomerase II inhibitor.

### **2.3.3. Micronucleus assay**

The CHO cells were seeded in tissue-culture flasks and incubated for 25 hours in 5 mL complete HAM-F10 / DMEM medium and washed with 5 mL of phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4). After this procedure, the cultures were treated in serum-free medium at the isolated concentrations of AU (7.5, 15 or 30 µg / mL), and the concentrations of AU 3.75; 7.5 or 15 µg / mL combination with the mutagen DXR (0.5 µg / mL). Negative (no treatment), solvent (DMSO, dimethylsulfoxide, Sigma-Aldrich, 0.3 µM) and positive (DXR) controls were also included.

After the treatment period, the cells were washed with PBS and a culture medium supplemented with fetal bovine serum containing 3 µg / mL of cytochalasin B (CAS 14930-96-2, Sigma-Aldrich) was added. After 3 hours, cells were rinsed with 5 mL PBS, trypsinized using 0.025% trypsin-EDTA and centrifuged for 5 min at 900 rpm. The pellet was hypotonized in sodium citrate 1% at 37 °C and then homogenized with a Pasteur pipette. This cell suspension was centrifuged again, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in methanol: acetic acid (3:1) and homogenized again with a Pasteur pipette. After fixation, the cells were stained in 3% Giemsa solution. The cells were analyzed in light microscopy at a magnification of 100 x.

The criteria used for the analysis of micronuclei and binucleate cells were established by Fenech (2000). For the analysis, 1000 cells were counted per culture in total of 3000 binucleate cells per treatment. The cytotoxicity of the treatments was evaluated by calculating the nuclear division index (NDI), determined by analysis of 500 cells per replicate, for a total of 1500 cells per treatment group. Cells with well-preserved cytoplasm containing 1 to 4 nuclei were counted and NDI was calculated using the formula of Eastmond and Tucker (1989).

$$\text{NDI} = \frac{[M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4)]}{N}$$

Where M1 - M4 is the number of cells with 1, 2, 3 and 4 nuclei, respectively, and N is the total number of viable cells.

#### **2.3.4. Statistical analysis**

The micronucleus test data were analyzed statistically by analysis of variance for completely randomized experiments, with statistical calculation  $\chi^2$  and respective values of  $\chi^2$ . When  $P < 0.05$ , the treatment media were compared by the Tukey's test and the minimum significant difference was calculated for  $\alpha = 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1. Aberrant crypt foci (ACF) assay**

**Table 1** shows the mean and standard deviation of the initial and final body weight, weight gain and water consumption in Wistar rats treated in the different experimental groups of the ACF assay. No statistically significant differences were observed in these variables between groups (Table pag 68).

The mean and standard deviation values of ACF (1-4 crypts), total ACF, total AC and AC/ACF (multiplicity of crypts) in the mid and distal colons in the 7 experimental groups of the ACF assay are shown in **Table 2**. ACF were observed in all DMH-treated rats but not in the negative controls (ultrapure water and Tween 5%). The frequencies of ACF and AC observed in animals

treated with Tween 5% associated with DMH were not significantly different from animals treated with DMH alone.

The presence of FCA was observed in all groups of animals treated with DMH. Animals receiving the different doses of soleus and DMH demonstrated statistically significant reductions in ACA and AC levels when compared to the group treated with DMH only. It was shown that the dose of 3,125 + DMH was the most effective as a chemopreventive against pre-neoplastic lesions induced by DMH.

### 3.2. Micronucleus assay

The micronucleus (MN) frequency in CHO cells treated with different concentrations of UA (7.5; 15 or 30 µg/mL) alone or the concentrations of AU (3.75; 7.5 OR 15 µg/MI) combined with DXR (0.5 µg/mL), and the nuclear division index (NDI) are shown in **Table 3**. No significant differences in MN induction were observed in the groups treated with UA (7.5 or 15 µg/mL) when compared to negative control ( $P>0.05$ ). AU (30 µg/mL) significantly increased the frequency of MN ( $P<0.05$ ), showing a genotoxic effect.

The DXR (0.5 µg/mL) and DMSO + DXR (0.5 µg/mL) significantly increased the frequency of MN ( $P<0.05$ ), showing a mutagenic effect. Nevertheless, a significant decrease in the frequency of MN was observed when DXR (0.5 µg/mL) was combined with UA (3.75 or 7.5 µg/mL), compared to positive control ( $P<0.05$ ). On the other hand, UA (15 µg/mL) significantly increased the frequency of MN, compared to positive control ( $P<0.05$ ).

The **Table 3** also displays the mean nuclear division index (NDI) and the respective standard deviation (SD) obtained for all treated groups. No significant differences were observed between the total induced MN in any treatment group compared to the negative control, demonstrating the absence of cytotoxicity of the different treatments under our experimental conditions.

## 4. Discussion

In this paper we investigated the protective effect of UA against pre-neoplastic foci induced by DMH in the rat colon, using the in vivo aberrant crypt

foci assay, and the mutagenic and modulatory potential of UA against DXR-induced genotoxicity in CHO cells, using the CBMN assay.

Analysis of the frequency of FCA demonstrated the protective effect of AU against pre-neoplastic lesions induced by DMH in the rat colon. The advantage of studying the pathogenesis of colon cancer induced by chemical carcinogens in animal models is that tumor induction is rapid and allows to reproduce the adenoma-carcinoma sequence as in humans (Senedese et al., 2013).

In the present study, it was used the period of five weeks for the FCA test, being one week of acclimatization, and four weeks of treatment, allowing the observation of high number of ACF containing a CA, which is in agreement with literature data (Alves et al., 2017, Chen et al., 2017).

Body weight and water consumption were monitored throughout the experimental period, demonstrating the absence of statistically significant differences between the variables. Thus, the doses used were non-toxic since weight loss and non-ingestion of water may be indicative of toxicity (Ibrahim et al., 2012)

The results observed in the ACF assay demonstrate the efficacy of DMH on the increased induction of mutation in colon epithelial cells, resulting in the formation of AC. The chemical agent DMH, used as a reference carcinogen, when metabolized, releases azomethane, azoxymethane, methylazoxymethanol, ethane, carbon dioxide and methyldiazonium, which are able to methylate DNA, RNA and proteins (Swenberg et al., 1979; Choudhary and Hansen, 1998). These metabolites are responsible for the methylation of DNA bases of various organs, including proliferating epithelial cells (Chang et al., 1984). DMH also induces carcinogenesis through increased peroxide production and consequently free hydroxyl radical which, in the presence of metal ions, may contribute to lipid peroxidation (Ghadi et al., 2012).

Treatment with UA was able to reduce the DMH-induced pre-neoplastic lesions, minimizing the frequency of carcinogenicity in the colon of rats. The reduction in the frequency of ACF was observed at all UA concentrations tested, being UA (3.125 mg / kg b.w) the most effective one. Thus, these results indicate that AU prevents DNA damage and the formation of pre-neoplastic lesions involved in the initial stage of colon cancer.

These results can be attributed to the antioxidant properties of UA, as demonstrated by studies of Odabasoglu et al. (2006) and Halici et al. (2005), which investigated the gastroprotective effects of UA in the indomethacin-induced gastric ulcers in rats. The gastric lesions were significantly reduced by all doses of UA. When antioxidant levels were evaluated, a significant increase of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and reduced glutathione (GSH), and an increase in the lipid peroxidation (LPO) level were observed, suggesting that the gastroprotective effect of UA can be attributed to its reducing effect on the oxidative damage.

When combined with bleomycin (BLM), UA was significantly more effective than BLM alone in inhibiting ascitic tumor growth on H22-bearing Kunming mice, arresting the cell cycle at G0/G1 phase, and promoting the cleaved caspase-3 and cleaved caspase-8 activities to induce cancer cellular apoptosis, whose mechanism may be associated with the transcriptional regulation of p53/p21/cyclin pathway (Su et al., 2017).

It was demonstrated *in vitro* that UA molecules also interact with cell membranes and lipid bilayers and locate in the outer monolayer of the human erythrocyte membrane, interacting with the polar head groups and to some extent also with fatty acid chain region of the lipid bilayer. Thus, it would act as an antioxidant by blocking access of oxidants, such as HClO, into cell membranes (Suwalsky et al., 2015).

The genotoxic and antigenotoxic potentials of UA were evaluated herein through the *in vitro* Cytokinesis Block Micronucleus (CBMN) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells, administering UA alone with non-cytotoxic UA concentrations (7.5, 15 or 30  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) or simultaneously to the chemotherapeutic agent DXR (0.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). The CBMN assay has been applied successfully for biomonitoring of *in vivo* genotoxin exposure and *in vitro* genotoxicity testing as well as a predictor of normal tissue and tumor radiation sensitivity and cancer risk (Fenech, 2007).

According to our results (Table 3) UA alone was not mutagenic at the lowest concentrations tested (7.5 and 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) while the highest concentration (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) induced approximately 2.5 folds more MN than the negative control. Similarly, in cultures of CHO cells treated with UA (7.5, 15 or 30  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) in combination with DXR (0.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) a reduction in MN frequency was observed

at concentrations of 3.75 and 7.5 µg / mL, while those treated with 30 µg / mL showed a significant increase in the MN frequency ( $P \leq 0.05$ ). These results may be due to the antioxidant and pro-oxidant activity of UA, and are similar to those obtained in previous studies.

Human lymphocytes (Jurkat-cells) incubated with UA in concentrations of  $1 \cdot 10^{-8}$  and  $1 \cdot 10^{-6}$  M showed a higher cell survival and a normal metabolism under low doses of UVB-light up to  $0.1 \text{ J/cm}^2$ . When both higher UVB doses (up to  $14 \text{ J/cm}^2$ ) and higher concentrations of UA ( $1 \cdot 10^{-4}$  M) were used, the opposite effect was observed. It is concluded that these effects are due to bifunctional anti-oxidative-pro-oxidative behaviour of usnic acid under UV-B-irradiation (Kohlhardt-Floehr et al., 2010). Combined administration of UA and methyl methanesulfonate (MMS) significantly reduced the frequencies of MN and DNA damage *in vitro* in V79 cells, and *in vivo* in Swiss mice, when compared to treatment with MMS alone (Leandro et al., 2013). The antioxidant activity of UA may explain these protective effects.

UA demonstrated genotoxic effects in the *in vitro* comet assay using V79 cells (Leandro et al., 2013) and human peripheral-blood lymphocytes (Prokopiev et al., 2017). Our previous study indicated that UA has recombinogenic, mutagenic and carcinogenic effects on somatic cells in *Drosophila melanogaster* (Machado et al., 2016). But, UA had no genotoxic effect by *in vivo* micronucleus assays in Swiss mice (Leandro et al., 2013) and *in vitro* micronucleus test in human lymphocytes (Koparal et al., 2006; Polat et al., 2016), V79 cells (Leandro et al., 2013) and chromosome aberration test in human lymphocytes *in vitro* (Polat et al., 2016). Nevertheless, when administered in combination with methyl methanesulfonate (MMS), UA significantly reduced the frequencies of micronuclei and DNA damage *in vitro* in V79 cells and *in vivo* in Swiss mice cells, when compared to treatment with MMS alone (Leandro et al., 2013).

Similar results were also obtained by our research group, which shown that the pro-oxidant properties of UA are susceptible to being also responsible for the recombination and mutation frequencies found in somatic cells of *Drosophila melanogaster* (Machado et al., 2016).

This is due to the fact that UA is a phenolic compound, which may combat oxidative stress by acting as an antioxidant or may unbalance cellular

redox state in the pro-oxidant sense, depending on the specific conditions such as cellular environment and quantity of the compound (Halliwell, 2008).

Doxorubicin (DXR) (also called Adriamycin® or 14-hydroxydaunorubicin) used as a positive control, is an anthracycline antibiotic that inhibits topoisomerase II and is used clinically as chemotherapeutic drug. DXR exhibits a broad spectrum of mechanisms of action. It binds to DNA-associated enzymes, intercalates with DNA base pairs, activate various molecular signals from AMPK (AMP-activated protein kinase inducing apoptosis) to influence the Bcl-2/Bax apoptosis pathway. By altering the Bcl-2/Bax ratio, downstream activation of different caspases can occur resulting in apoptosis. Doxorubicin also induces apoptosis and necrosis in healthy tissue causing toxicity. The primary cardiotoxic action of DXR is attributed to the generation of reactive oxygen species (ROS). At a non-cytotoxic dose induces DNA breaks (Tacar et al., 2012; Asensio-López et al., 2017; Beaud et al., 2017; Luthra et al., 2017).

DXR has been reported to induce micronuclei *in vitro* and *in vivo* and has been widely used in antigenotoxicity assays (Boriollo et al., 2014; Jagetia and Venkatesh, 2015; Oliveira et al., 2017).

Thus, MN induction by DXR may result from chromosome breakdown, due to failure to repair DNA lesions, or to incorrect segregation during mitotic cycle, events that may be induced by oxidative stress, clastogenic exposure, genetic defects in the cell cycle and / or DNA repair genes (Fenech, 2005; Bonassi et al., 2007). Thus, the reduction of chromosomal aberration observed in the present study suggests that the UA mechanism of action is directly related to the modulation of DXR activity, demonstrating that AU, at the concentrations tested, was effective in preventing DXR-induced damage.

In conclusion, under these experimental conditions, the enantiomer (+) - usnic acid had no carcinogenic effects in Wistar rats *in vivo*, but modulated the frequency of colorectal pre-neoplastic lesions previously induced by 1,2-Dimethylhydrazine. At low concentrations, UA was not genotoxic in Chinese hamster ovary (CHO) cells, but at high concentration, significantly increased the frequency of MN. Combined with DXR, at low concentration, had a protective effect against DXR-induced MN, but at high concentration enhanced the frequency of MN. Although the mechanisms underlying the protective effect of UA are not completely understood, taken together, these findings suggest that

under certain conditions UA may exert antioxidant or pro-oxidant features. Nevertheless, it seems to be more a redox modulatory molecule, with promising qualities as a co-adjuvant chemotherapeutic in the treatment of cancer.

### **Conflict of interest**

The authors did not report any conflict of interest.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Universidade de Franca (UNIFRAN), Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) and Universidade Federal de Uberlândia.

### **5. References**

- Albertini, R.J.; Anderson, D.; Douglas, G.R.; Hagmar, L.; Hemminki, K.; Merlo, F.; Natarajan, A.T.; Norppa, H.; Shuker, D.E.; Tice, R.; Waters, M.D; Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat. Res.* 463, 111-172. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00049-1)
- Alves, J.M.; Senedese, J.M.; Leandro, L.F.; Castro, P.T.; Pereira, D.E.; Carneiro, L.J.; Ambrósio, S.R.; Bastos, J.K.; Tavares, D.C., 2017. *Copaifera multijuga* oleoresin and its constituent diterpene (-)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. *Mutat. Res.* 819, 26-30. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.05.001>
- Araújo, A.A.; de Melo, M.G.; Rabelo, T.K.; Nunes, P.S.; Santos, S.L.; Serafini, M.R.; Santos, M.R.; Quintans-Júnior, L.J.; Gelain, D.P., 2015. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Nat. Prod. Res.* 29, 2167-1280. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1007455>
- Bazo, A.P.; Rodrigues, M.A.; Sforcin, J.M.; de Camargo, J.L.; Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F., 2002. Protective action of propolis on the rat colon



carcinogenesis. Teratog. Carcinog. Mutagen. 22, 183-194.  
<https://doi.org/10.1002/tcm.10011>

- Beaud, H.; van Pelt, A.; Delbes, G., 2017. Doxorubicin and vincristine affect undifferentiated rat spermatogonia. *Reproduction* 153, 725-735.
- Bird, R.P., 1987. Observation and qualification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 37, 147–51. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(87\)90157-1](https://doi.org/10.1016/0304-3835(87)90157-1)
- Bonassi, S.; Znaor, A.; Ceppi, M.; Lando, C.; Chang, W.P.; Holland, N.; Kirsch-Volders, M.; Zeiger, E.; Ban, S.; Barale, R.; Bigatti, M.P.; Bolognesi, C.; Cebulska-Wasilewska, A.; Fabianova, E.; Fucic, A.; Hagmar, L.; Joksic, G.; Martelli, A.; Migliore, L.; Mirkova, E.; Scarfi, M.R.; Zijno, A.; Norppa, H., Fenech, M., 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28, 625-631. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>
- Boriollo, M.F.; Resende, M.R.; da Silva, T.A.; Públio, J.Y.; Souza, L.S.; Dias, C.T.; de Mello, S.O.N.; Fiorini, J.E., 2014. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart. bark in the micronucleus assay. *Genet. Mol. Biol.* 37, 428-438. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572014000300016>
- Chang, W.W., 1984. Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scand. J. Gastroenterol.* 104, 27-43.
- Chen, H.P.; Pan, M.H.; Chou, Y.Y.; Sung, .C; Lee, K.H.; Leung, C.M.; Hsu, P.C., 2017. Effects of di(2-ethylhexyl)phthalate exposure on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumor promotion in rats. *Food Chem. Toxicol.* 103, 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.014>
- Chen, S.; Dobrovolsky, V.N.; Liu, F.; Wu, Y.; Zhang, Z.; Mei, N.; Guo, L., 2014. The role of autophagy in usnic acid-induced toxicity in hepatic cells. *Toxicol Sci.* 142, 33-44. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu154>
- Choudhary, G.; Hansen, H., 1998. Human health perspective on environmental exposure to hydrazines: A review. *Chemosphere* 37, 801-843. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00088-5)
- Deepa Parvathi, V., Rajagopal, K., 2014. Nanotoxicology testing: Potential of *Drosophila* in toxicity assessment of nanomaterials. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol.* 5, 25-35.

- Ding, X.; Kaminsky, L.S., 2003. Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 149-173. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140251>
- Eastmond, D.A.; Tucher, J.D., 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13, 34-43. <https://doi.org/10.1002/em.2850130104>
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 455, 81-95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Fenech, M., 2005. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol. Med.* 111, 3-32. <https://doi.org/10.1385/1-59259-889-7:003>
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2, 1084-1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- Fernández-Moriano, C.; Divakar, P.K.; Crespo, A.; Gómez-Serranillos, M.P. ; 2017. Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. *Food Chem. Toxicol.* 105, 262-277. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.030>
- Galanty, A.; Koczurkiewicz, P.; Wnuk, D.; Paw, M.; Karnas, E.; Podolak, I.; Węgrzyn, M.; Borusiewicz, M.; Madeja, Z.; Czyż, J.; Michalik, M., 2017. Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and melanoma cancer cells. *Toxicol. in Vitro* 40, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.008>
- Ghadi, F.E.; Malhotra, A.; Ghara, A.R.; Dhawan, D.K., 2012. Selenium as a modulator of membrane stability parameters and surface changes during the initiation phase of 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 369, 119-126. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1374-z>
- Halici, M.; Odabasoglu, F.; Suleyman, H.; Cakir, A.; Aslan, A.; Bayir, Y., 2005. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phytomedicine* 12, 656-662. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.06.021>
- Halliwell, B., 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch. Biochem. Biophys.*

476,107-112. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.028>

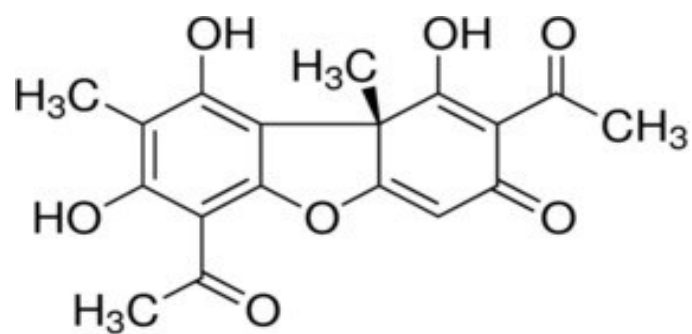
- Ibrahim, N.B.; Eweis, E.A.; EL-Beltagi, H.S.; Abel-Mobdy, Y. E. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2, 41-46. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60187-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60187-1)
- Ingólfssdóttir, K., 2002. Usnic acid. *Phytochemistry* 61, 729-736. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)
- Jagetia, G.C.; Venkatesh, P., 2015. Bael, *Aegle marmelos* (L.) Correa, an Indian medicinal plant protects V79 cells against the genotoxic effect of Doxorubicin. *Int. J. Genet. Molec. Biol.* 7, 32-46. <https://doi.org/10.5897/IJGMB2011.014>
- Kagemoto, K.; Okamoto, K.; Takaoka, T.; Okada, Y.; Tanaka, K.; Hirao, A.; Kitamura, S.; Kimura, T.; Miyamoto, H.; Muguruma, N.; Okahisa, T.; Tsuneyama, K.; Takayama, T., 2017. Detection of aberrant crypt foci using image-enhanced endoscopy. *Gastrointest. Endosc.* 85, B2522017. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2017.03.568>
- Kohlhardt-Floehr, C.; Boehm, F.; Troppens, S.; Lademann, J.; Truscott, T.G., 2010. Prooxidant and antioxidant behavior of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. *J. Photoch. Photobio. B: Biology* 101, 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.06.017>
- Koparal, A.T.; Tüylü, B.A.; Türk, H., 2006. In vitro cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. *Nat. Prod. Res.* 20, 1300-1307. <https://doi.org/10.1080/14786410601101910>
- Koparal, A.T., 2015. Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances (-)-usnic acid and vulpinic acid. *Z. Naturforsch.* 70, 159-164. <https://doi.org/10.1515/znc-2014-4178>
- Leandro, L.F.; Munari, C.C.; Sato, V.L.; Alves, J.M.; de Oliveira, P.F.; Mastrocola, D.F.; Martins, S. de P.; Moraes, T. da S.; de Oliveira, A.I.; Tozatti, M.G.; Cunha, W.R.; Tavares, D.C., 2013. Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays. *Mutat Res.* 753, 101-106. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.03.006>
- Luthra, P.; Aguirre, S.; Yen, B.C.; Pietzsch, C.A.; Sanchez-Aparicio, M.T.; Tigabu, B.; Morlock, L.K.; García-Sastre, A.; Leung, D.W.; Williams, N.S.;

- Fernandez-Sesma, A.; Bukreyev, A.; Basler, C.F., 2017. Topoisomerase II inhibitors induce DNA damage-dependent interferon responses circumventing Ebola virus immune evasion. *mBio* 8:e00368-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00368-17>
- Machado, N.M.; de Rezende, A.A.A.; Nepomuceno, J.C.; Tavares, D.C.; Cunha, W.R.; Spanó, M.A., 2016. Evaluation of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of (+)-usnic acid in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 96, 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.005>
- Martins, M.C.B.; Silva, M.C.; Silva, L.R.S.; Lima, V.L.M.; Pereira, E.C.; Falcão, E.P.S.; Melo, A.M.M.A.; Silva, N.H., 2014. Usnic Acid potassium salt: An alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *PLoS One* 9, e111102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111102>
- Mayer, M.; O'Neill, M.A.; Murray, K.E.; Santos-Magalhães, N.S.; Carneiro-Leão, A.M.; Thompson, A.M.; Appleyard, V.C., 2005. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anti-cancer Drug* 16, 805-809. <https://doi.org/10.1097/01.cad.0000175588.09070.77>
- Modugno, F.; Knoll, C.; Kanbour-Shakir, A.; Romkes, M., 2003. A potential role for the estrogen-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 82, 191-197. <https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000004376.21491.44>
- Munari, C.C.; de Oliveira, P.F.; Leandro, L.F.; Pimenta, L.M.; Ferreira, N.H.; da Costa, J.C.; Bastos, J.K.; Tavares, D.C. *In vivo* assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloidic extract. *PLoS One* 9, e111999, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111999>
- Nguyen, T.T.; Yoon, S.; Yang, Y.; Lee, H.B.; OH, S.; Jeong, M.H.; Kim, J.J.; Yee, S.T.; Crişan, F.; Moon, C.; Lee, K.Y.; Kim, K.K.; Hur, J.S.; Kim, H., 2014. Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. *PLoS One* 9, e111575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111575>
- Odabasoglu, F.; Cakir, A.; Suleyman, H.; Aslan, A.; Bayir, Y.; Halici, M.; Kazaz, C., 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J. Ethnopharmacol.* 103, 59-65.

- Oliveira, V.C.; Constante, S.A.R.; Orsolin, P.C.; Nepomuceno, J.C.; de Rezende, A.A.A.; Spanó, M.A., 2017. Modulatory effects of metformin on mutagenicity and epithelial tumor incidence in doxorubicin-treated *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 106, 283-291. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.043>
- Polat, Z.; Aydın, E.; Türkez, H.; Aslan, A., 2016. In vitro risk assessment of usnic acid. *Toxicol. Ind. Health* 32, 468-475. <https://doi.org/10.1177/0748233713504811>
- Prokopiev, I.A.; Filippov, E.V.; Filippova, G.V.; Gladkina, N.P., 2017. Genotoxicity of usnic-acid enantiomers in vitro in human peripheral-blood lymphocytes. *Cell Tiss. Biol.* 11, 141-146. <https://doi.org/10.1134/S1990519X17020031>
- Ribeiro-Costa, R.M.; Alves, A.J.; Santos, N.P.; Nascimento, S.C.; Gonçalves, E.C.; Silva, N.H.; Honda, N.K.; Santos-Magalhães, N.S., 2004. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J Microencapsul.* 21, 371-84. <https://doi.org/10.1080/02652040410001673919>
- Rodrigues, M.A.; Silva, L.A.; Salvadori, D.M.F.; de Camargo, J.L.; Montenegro, M.R., 2002. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 351-355. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002000300010>
- Senedese, J.M.; Alves, J.M.; Lima, I.M.S.; de Andrade, E.A.P.; Furtado, R.A.; Bastos, J.K.; Tavares, D.C., 2013. Chemopreventive effect of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroalcoholic extract on 1,2 dimethylhydrazine-induced DNA damage and preneoplastic lesions in rat colon. *BMC Complement. Altern. Med.* 7, 13-16. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-3>
- Silva, C.R.; Marinho, K.S.N.; Silva, T.D.S.; Ferreira, D.K.S.; Aguiar, G.M.; Martins, M.C.B.; Santos, K.R.P.; Aguiar Júnior, F.C.A.; Santos, N.P.S.; Pereira, E.C.; Silva, N.H., 2017a. Teratogenic effect of usnic acid from *Cladonia substellata* Vainio during organogenesis. *BioMed Res. Int.* Article ID 5948936, 7 pages.
- Silva, I.C.; Polaquini, C.R.; Regasini, L.O.; Ferreira, H.; Pavan, F.R., 2017b. Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. *Food Chem. Toxicol.* 105,

300-307. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.033>

- Su, Z.Q.; Liu, Y.H.; Guo, H.Z.; Sun, C.Y.; Xie, J.H.; Li, Y.C.; Chen, J.N.; Lai, X.P.; Su, Z.R.; Chen, H.M., 2017. Effect-enhancing and toxicity-reducing activity of usnic acid in ascitic tumor-bearing mice treated with bleomycin. *Int. Immunopharmacol.* 46, 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.03.004>
- Suwalsky, M.; Jemiola-Rzeminska, M.; Astudillo, C.; Gallardo, M.J.; Sataforelli, J.P.; Villena, F.; Strzalka, K., 2015. An *in vitro* study on the antioxidant capacity of usnic acid on human erythrocytes and molecular models of its membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1848, 2829-2838. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.08.017>
- Swenberg, J.A.; Cooper, H.K.; Bücheler, J.; Kleihues, P., 1979. 1,2-Dimethylhydrazine-induced methylation of DNA bases in various rat organs and the effect of pretreatment with disulfiram. *Cancer Res.* 39, 465-467.
- Tacar, O.; Sriamornsak, P.; Dass, C.R., 2012. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 157-170. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
- Thadhani, V.M.; Karunaratne, V., 2017. Potential of Lichen Compounds as Antidiabetic Agents with Antioxidative Properties: A Review. *Oxid. Med. Cell. Longev.* ID 2079697, 10 pages.
- Tudek, B.; Bird, R.P.; Bruce, W.R., 1989. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res.* 49, 1236-1240.
- Yang, Y.; Nguyen, T.T.; Jeong, M.-H.; Crisan, F.; Yu, Y.H.; Ha, H.- H.; Choi, H.K.; Jeong, G.H.; Jeong, C.T.; Lee, Y.K.; KIM, K.K.; Hur, S.J.; Kim, H., 2016. Inhibitory activity of (+)-usnic acid against non-small cell lung cancer cell motility. *Plos One* 11, e0146575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146575>
- Yu, X.; Guo, Q.; Su, G.; Yang, A.; Hu, Z.; Qu, C.; Wan, Z.; Li, R.; Tu, P.; Chai, X., 2016. Usnic acid derivatives with cytotoxic and antifungal activities from the lichen *Usnea longissimi*. *J. Nat. Prod.* 79, 1373-1380. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00109>



**Fig. 1.** Structural formula of (+)- usnic acid.

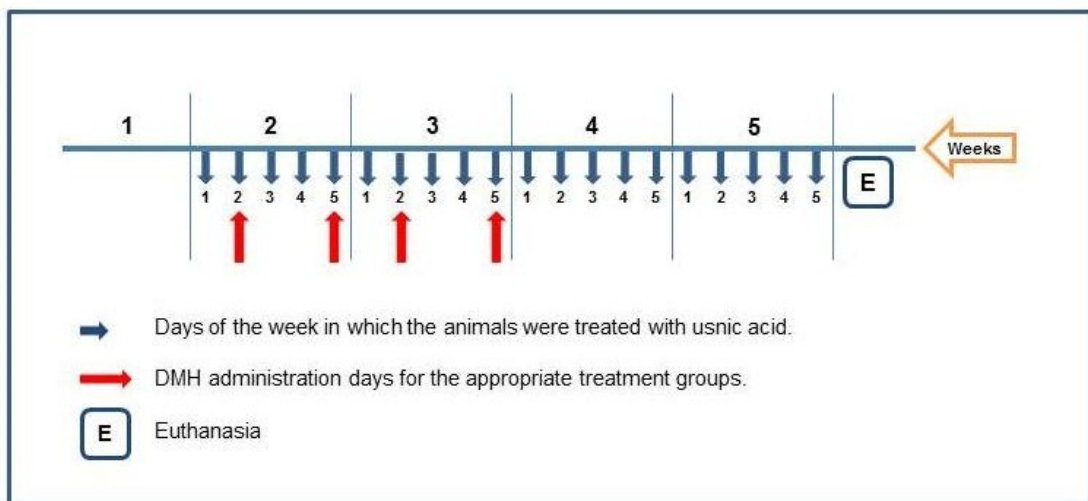


Fig. 2. Schematic of the experimental procedure with Wistar rats for treatments with (+)-usnic acid (UA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH), using the aberrant crypt foci (ACF) as biomarker.



**Table 1.** Mean and standard deviation of the initial weight, final weight, weight gain and water consumption observed in Wistar rats treated with different concentrations of usnic acid (UA) (3.125; 12.5 or 50.0 mg / kg b.w.) + 1,2-dimethylhydrazine (DMH) (160 mg/kg b.w), Ultrapure water (negative control), Tween 5% (solvent control), DMH (160 mg/kg b.w), and tween 5% + DMH (160 mg/kg b.w) during four weeks for the aberrant crypt foci (ACF) assay.

<b>Treatments (mg/kg b.w.)</b>	<b>Initial weight (g)</b>	<b>Final weight (g)</b>	<b>Weight gain (g)</b>	<b>Water consumption (mL/animal/day)</b>
Control	165.2 ± 5.119	428.0 ± 21.89	262.8 ± 21.65	59.32 ± 11.06
Tween	138.6 ± 11.78	349.6 ± 36.84	211.0 ± 32.46	50.78 ± 7.801
DMH	155.8 ± 19.48	316.0 ± 29.61	160.2 ± 41.01	54.93 ± 14.65
Tween + DMH	145.8 ± 5.975	320.8 ± 33.79	175.0 ± 31.98	53.94 ± 15.25
AU 3.125 + DMH	151.0 ± 14.61	326.2 ± 54.51	175.2 ± 44.04	56.02 ± 15.40
AU 12.5 + DMH	146.0 ± 10.46	322.6 ± 33.46	176.6 ± 27.79	55.10 ± 10.10
AU 50.0 + DMH	136.6 ± 5.595	265.2 ± 47.88	128.6 ± 44.94	51.62 ± 14.60

**Table 2.** Mean and standard deviation of aberrant crypt foci (ACF) and aberrant crypt (AC) observed in distal colon of Wistar rats treated with different concentrations of usnic acid (UA) (3.125; 12.5 or 50.0 mg / kg b.w.) + 1,2-dimethylhydrazine (DMH) (160 mg/kg b.w), Ultrapure water (negative control), Tween 5% (solvent control), DMH (160 mg/kg b.w), and tween 5% + DMH (160 mg/kg b.w) during four weeks for the aberrant crypt foci (ACF) assay.

Treatments (mg/kg b.w.)	ACF				Total ACF	Total AC	Relation AC/ACF
	1 crypt	2 crypts	3 crypts	4 crypts			
DMH	21.8 ± 6.91	5.80 ± 3.63	3.60 ± 2.41	1.00 ± 1.22	30.6 ± 1.52	45.4 ± 8.26	1.48 ± 0.26
Tween + DMH	20.0 ± 2.74	5.40 ± 2.61	1.60 ± 1.34	1.00 ± 1.00	28.0 ± 3.54	39.6 ± 10.3	1.40 ± 0.20
UA 3.125 + DMH	11.6 ± 1.52	2.60 ± 1.67	1.00 ± 0.71	0.40 ± 0.55	15.6 ± 0.55 <sup>a</sup>	22.0 ± 1.87 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.09
UA 12.5 + DMH	14.0 ± 1.87	2.60 ± 0.89	0.60 ± 0.89	0.40 ± 0.55	17.6 ± 1.82 <sup>a</sup>	22.6 ± 3.05 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.11
UA 50.0 + DMH	15.6 ± 1.52	2.40 ± 1.52	1.00 ± 1.00	0.20 ± 0.45	19.2 ± 1.92 <sup>a</sup>	24.2 ± 5.36 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.18

a. Statistical diagnoses according to analysis of variance (ANOVA). Level of significance  $P < 0.05$ .

**Table 3.** Frequency of micronuclei (MN) and nuclear division index (NDI) observed in Chinese hamster ovary (CHO) cells treated with different concentrations of usnic acid (UA) (7.5; 15 or 30 µg/mL) alone or combined with DXR (0.5 µg/mL), ultrapure water (negative control), DMSO (solvent control) and DMSO + DXR (positive control).

Tratamentos µg/mL	Frequency of MNs <sup>a</sup>	NDI <sup>b</sup>
	Mean ± SD	Mean ± SD
Negative control	6.33 ± 1.53	1.66 ± 0.04
DMSO	7.00 ± 2.00	1.65 ± 0.04
AU 7.5	8.33 ± 3.79	1.53 ± 0.03
AU 15	8.00 ± 3.00	1.58 ± 0.03
AU 30	14.33 ± 2.08 <sup>c</sup>	1.62 ± 0.01
DXR	22.67 ± 1.15 <sup>c</sup>	1.68 ± 0.06
DMSO + DXR	18.33 ± 1.15 <sup>c</sup>	1.71 ± 0.04
AU 3.75 + DXR	13.00 ± 3.61 <sup>d,e</sup>	1.59 ± 0.01
AU 7.5 + DXR	12.00 ± 2.00 <sup>d,e</sup>	1.60 ± 0.04
AU 15 + DXR	27.00 ± 1.00 <sup>d</sup>	1.60 ± 0.08

<sup>a</sup> 3000 binucleated cells were analyzed per treatment group.

<sup>b</sup> 1500 cells were analyzed per treatment group.

<sup>c</sup> Significantly different from negative control group ( $P < 0.05$ ).

<sup>d</sup> Significantly different from positive control group ( $P < 0.05$ ).

<sup>e</sup> Significantly different from AU 15 + DXR group ( $P < 0.05$ ).

---

---

## **CAPÍTULO III**

**Evaluation of mutagenic, recombinogenic and  
carcinogenic potential of (+)-usnic acid in somatic cells  
of *Drosophila melanogaster***

---

---

**Food and Chemical Toxicology, v. 96, p. 226-233, 2016.**

**doi: 10.1016/j.fct.2016.08.005.**

**(Anexo 2 – pág. 104)**



**Evaluation of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of (+)-usnic acid in somatic cells of *Drosophila melanogaster***

Nayane Moreira Machado<sup>a</sup>, Alexandre Azenha Alves de Resende<sup>b</sup>, Júlio César Nepomuceno<sup>a,c,†</sup>, Denise Crispim Tavares<sup>d</sup>, Wilson Roberto Cunha<sup>d</sup>, Mário Antônio Spanó<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil*

<sup>b</sup>*Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Ciências Integradas do Pontal. Ituiutaba, Minas Gerais, Brazil.*

<sup>c</sup>*Centro Universitário de Patos de Minas, Laboratório de Genética e Mutagênese, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil*

<sup>d</sup>*Universidade de Franca, Franca, São Paulo, Brazil*

† Deceased June 01, 2016

\*Corresponding author. Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese. Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia – MG 38400-902, Brazil  
E-mail address: maspano@ufu.br (M. A. Spanó)

**Highlights:**

- The mutagenic and carcinogenic potential of the enantiomer (+) – usnic acid (UA) was studied *in vivo*.
- Usnic acid have mutagenic and recombinogenic action in standard and high-bioactivation crosses.
- Increasing the metabolic capacity increases the toxic effect of (+) – usnic acid (UA).

## **Abstract**

The main of this study was to evaluate the mutagenic and carcinogenic potential of (+) – usnic acid (UA), using Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) and the test for detecting epithelial tumor clones (*wts*) in *Drosophila melanogaster*. Larvae from 72±4 h from *Drosophila* were fed with UA (5.0, 10.0 or 20.0 mM); urethane (10.0 mM) (positive control); and solvent (Milli-Q water, 1% Tween-80 and 3% ethanol) (negative control). ST cross produced increase in total mutant spots in the individuals treated with 5, 10 or 20 mM of UA. HB cross produced spot frequencies in the concentration of 5 mM that were higher than the frequency for the same concentration in the ST cross. In the highest concentrations the result was negative, which means that the difference observed can be attributed, in part, to the high levels of P450, suggesting that increasing the metabolic capacity maximized the toxic effect of these doses. In the evaluation of carcinogenesis using the *wts* test, the results obtained for the same concentrations of UA show a positive result for the presence of tumors when compared to the negative control. We conclude that UA has recombinogenic, mutagenic and carcinogenic effects on somatic cells in *D. melanogaster*.

**Keywords:** Gene *wts*; SMART; Somatic Mutation and Recombination Test; Tumor; Warts.



## 1. Introduction

Lichen is an association of a heterotrophic organism (mycobiont) and an autotrophic organism (photobiont) (Martins et al., 2014), capable of producing a variety of substances with phenolic characteristics, called lichenic substances (Fernández-Moriano et al., 2015). These substances, also known as lichenic acids, are secondary metabolites, and include depsides, depsidones, benzyl esters, dibenzofurans, usnic acids, xanthonones, anthraquinones and derivatives of pulvinic acid (Johnson et al., 2011).

Usnic acid (UA), in addition to be considered one of the most important biologically active metabolites of lichens, has also received the most study (Ingólfssdóttir, 2002). It is characterized as a yellow pigment, of low molecular weight (344.32 g), insoluble in water and glycerol, and partially soluble in ethanol and easily soluble in ether, acetone, chloroform and ethyl acetate (Kristmundsdóttir et al., 2002). It is widely distributed in the genera *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* and *Evernia*, and can be found in two enantiomeric forms: (-) - usnic acid and (+) - usnic acid (Leandro et al., 2013).

A wide range of biological activities have been reported for UA, including anti-microbial, antiviral, anti-proliferative, anti-inflammatory, antitumoral, anti-mitotic, anti-fungal and analgesic actions (Lauterwein et al., 1995; Perry et al., 1999; Kristmundsdóttir et al., 2002; Vijayakumar et al., 2000; Mayer et al., 2005; Campanella et al., 2002).

Low doses of (+)-usnic acid showed high cytotoxic activity against cancerous cells (Koparal et al., 2006). UA showed activity against the wild-type p53 breast cancer cell line MCF7 as well as the non-functional p53 breast cancer cell line MDA-MB-231 and the lung cancer cell line H1299 (null for p53) (Mayer et al., 2005). It has also been shown that UA has an apoptotic effect in human cancer lineages, significantly reducing cellular viability and inducing apoptosis in ovarian carcinoma, cervical adenocarcinoma, breast adenocarcinoma, colon adenocarcinoma, promyelocytic leukemia and T-cell leukemia (Bačkorová et al., 2011; Bézivin et al., 2003; Burlando et al., 2009; Einarsdóttir et al., 2010; Ren et al., 2009).

However, *in vitro* studies have revealed that UA induces damage to cell membranes, and inhibits mitochondrial function of hepatocytes, leading to an increase in the production of reactive oxygen species, and inducing oxidative

stress (Han et al., 2004; Pramyothin et al., 2004). And, as shown by Yokouchi et al. (2015), UA also induces myocardial toxicity in rats from mitochondrial dysfunction and oxidative stress.

There are limited data on the genotoxic/mutagenic/carcinogenic properties of UA. Previous studies have shown that UA induced DNA damage in V79 cells in vitro assessed by the comet assay (Leandro et al., 2013). Nevertheless, UA was not genotoxic/mutagenic in human lymphocytes in vitro, when assessed by cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) assay, chromosomal aberrations (CA) and micronucleus (MN) tests (Koparal et al., 2006; Polat et al., 2016) neither in V79 cells in vitro, using MN test (Leandro et al., 2013) and in Swiss mice in vivo, using MN and comet assays (Leandro et al., 2013). Furthermore, UA exerted a protective effect against the chromosomal and genome damage induced by methyl methanesulfonate (MMS) in V79 cells in vitro and in Swiss mice in vivo (Leandro et al., 2013). Thus, due to conflicting results observed in the literature, it can be concluded that genotoxicity / mutagenicity / carcinogenicity of UA needs further studies.

There are no records of research with UA using *Drosophila melanogaster* as a test organism. According to Akmoutsou et al. (2011), *Drosophila* is considered a model organism for genetic studies in eukaryotes, as well as in the evaluation of toxic, mutagenic and carcinogenic effects.

In order to obtain a more detailed understanding of the toxicity and the mutagenic and carcinogenic profile of the substance, the somatic mutation and recombination test - SMART and the test for detection of epithelial tumor clones (*wts*) were used, both with *D. melanogaster*. Potential for mutation, recombination and carcinogenesis, as well as toxicity of exposure to different concentrations were determined.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 (+) – Usnic acid**

The UA (**Fig. 1**) used in this study was kindly provided by Denise Crispim Tavares PhD, of the Natural Products Research Group of the University of Franca (UNIFRAN), Franca, SP, Brazil. Additional information about the isolation and purification of UA can be found in Leandro et al. (2013).

## 2.2 Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in somatic cells of *D. melanogaster*

### 2.2.1 Lineages of *D. melanogaster*

Three mutant lineages of *D. melanogaster*, used for the SMART, were supplied by Dr. Ulrich Graf, of the Swiss Federal Institute of Technology in Zurich (ETHZ), Schwerzenbach, Switzerland. The stocks of these lineages are kept in tubes containing culture medium prepared with water, yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), agar, banana and nipagin, inside a B.O.D. incubator at a temperature of approximately 25°C and relative humidity of 60% and photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of darkness.

The three lineages used: *mwh*, *flr*<sup>3</sup> and *ORR* possess the genetic markers *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0.3) and *flare-3* (*flr*<sup>3</sup>, 3-38.8) (Graf et al., 1989). In the lineage resistant to *DDT*, *Oregon R* (R), the gene *Rl* at position 65.0 on chromosome-2, is responsible for high levels of cytochrome P450 expression, typical of this lineage. Chromosomes 1 and 2 of lineage *flr*<sup>3</sup> were therefore substituted with chromosomes 1 and 2 of the lineage *Oregon R* (R) (Frölich and Würigler, 1989).

### 2.2.2 Crosses

Three *D. melanogaster* strains with the genetic markers multiple wing hairs (*mwh*, 3-0.3) and flare-3 (*flr*<sup>3</sup>, 3-38.9) were used: (1) multiple wing hairs (*mwh/mwh*); (2) flare-3 (*flr*<sup>3</sup>/*In*(3LR)TM3, *ri p<sup>p</sup> sep I*(3)89Aa *bx34<sup>e</sup> and Bd<sup>S</sup>*); and (3) *ORR*; flare-3 (*ORR/ORR*; *flr*<sup>3</sup>/*In*(3LR)TM3, *ri p<sup>p</sup> sep I*(3)89Aa *bx34<sup>e</sup> and Bd<sup>S</sup>*). The *ORR*; flare-3 strain has chromosomes 1 and 2 from a *DDT*-resistant *Oregon R*(R) line, which are responsible for a high constitutive level of cytochrome P450 enzymes (Graf and van Schaik, 1992). Two types of crosses were conducted for the experiment: Standard Cross (ST) using virgin females flare-3 crossed with males multiple wing hairs (Graf et al., 1984; 1989); High Bioactivation (HB) Cross using virgin females *ORR*; *flr*<sup>3</sup> crossed with males multiple wing hairs (Graf and van Schaik, 1992).

These crosses produced two types of progeny: trans-heterozygous individuals for the marker genes (MH), and heterozygous individuals for the chromosome TM3 (BH) (Graf et al., 1984). The BH individuals are different

phenotypically from the MH individuals due to the presence of serrations on the edges of their wings, characteristics conferred by the marker *Bd<sup>S</sup>* (Graf et al., 1984).

### 2.2.3 Treatment

After the lineages were crossed, the couples were transferred to tubes containing hatching medium, where they remained for 8 hours. After 72, ±4 hours from the start of the hatching period, the third-stage larvae were collected, washed with water and collected with the aid of a fine mesh sieve.

The larvae collected were placed in glass tubes containing 1.5 g instantaneous mashed potato (Yoki Alimentos, São Bernardo do Campo, SP, Brazil) with 5 mL of different concentrations of UA (5; 10 or 20 mM). The UA was dissolved in a mixture of 1% Tween-80 and 3% ethanol in ultrapure water, which was used as a negative control, while urethane was used for the positive control (10 mM). The concentrations were chosen based on the survival rates of a dose-response test. Where the larvae were counted before distribution and collected in previously identified tubes. After hatching they were stored in 70% ethanol for later analysis.

After removing the wings of the flies under a stereoscopic microscope, the slides of the treated adult wings were mounted using Faure's solution [gum arabic (30 g), glycerol (20 mL), water (50 mL) and chloral hydrate (50 g)] and analyzed under an optical microscope at a magnification of 400 to identify spots of mutant hairs that could be classified as simple (*mwh* or *flr<sup>3</sup>*) or twin (*mwh* and *flr<sup>3</sup>*) (Graf et al., 1984).

### 2.2.4 Statistical analysis

The data obtained were analyzed according to Frei and Würigler (1988, 1995), using a multiple-decision procedure, binomial conditional test by Kastenbaum and Bowman (1970) used to decide if a result is positive, negative or inconclusive, and also the chi-squared test used for comparing survival rate statistics of the samples tested. A significance level of 5% was used for each test.

## 2.3 Detection of epithelial tumor in *D. melanogaster*

### 2.3.1 Lineages, Crosses and Treatment

Two mutant lines of *D. melanogaster*, *wts* and *mwh*, were used in this test. The lineage *wts* was supplied by the Bloomington *Drosophila* Stock Center at Indiana University, USA. The stocks of these lineages are kept in tubes containing standard culture medium, in a B.O.D incubator at a temperature of approximately 25°C and relative humidity of 60% and photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of darkness.

The line *wts* carries the genetic marker warts (*wts*, 3-100), orthologous to human LATS1, a tumor suppressing gene, which negatively regulates cyclin-dependent kinase DmCdk1 (human CDC2) in the G2 phase for the M phase of the cell cycle (Tao et al., 1999).

The marker *wts* is a lethal recessive mutation during homozygosis, in zygotes. But mitotic recombination in heterozygotes can induce the formation of mutant clones that manifest themselves as tumors in the epidermis of adult flies (Sidorov et al., 2001).

To obtain heterozygous descendents *wts*<sup>+/+</sup>*mwh*, virgins female *wts*/*TM3*, *Sb*<sup>1</sup> were crossed with males *mwh*/*mwh*. The descendents were collected over a period of 8 h. After 72 ± 4 h, third-stage larvae were washed in water and collected using a fine mesh sieve.

These larvae were submitted to chronic treatment of 48 hours in a glass tube containing 1.5 g of mashed potatoes and 5 ml of different concentrations of UA: 5; 10 or 20 mM. Doxorubicin (DXR 0.4 mM) was used as a positive control and as solvent and negative control 1% Tween-80 and 3% ethanol in ultrapure water was used.

After metamorphosis, adult individuals were transferred to containers with 70% ethanol, and then the individuals with genotype (*wts* <sup>+/+</sup> *mwh*), without the balancer chromosome (*TM3*, *Sb*<sup>1</sup>), which have phenotypically wild hairs (long and thin) were analyzed. Tumor presence was evaluated and recorded on a spreadsheet.

### 2.3.2 Statistical analysis

To evaluate the frequencies of tumors found in the different concentrations of UA, nonparametric Mann-Whitney test was used at a significance level of  $p < 0.05$ .

## 3. Results

The aim of the present study was to evaluate the mutagenic and carcinogenic potential of UA, using the SMART and the test for detecting epithelial tumor clones (*wts*) in *Drosophila melanogaster*.

### 3.1 SMART

The concentrations of UA used in this study were selected based on survival rates from a dose-response test, which is presented in **Fig 2**.

The lowest concentration of UA (5 mM) presented low toxicity in the ST and HB crosses; however, as the concentrations rose, the survival rates fell in relation to the negative control group. This shows the toxicity of the highest concentration (20 mM) in the ST cross and most significantly in the HB cross. Although 20 mM had significantly reduced survival rates, this and the other concentrations were tested to evaluate the ability to induce damage on the DNA of somatic cells in *D. melanogaster*.

**Table 1** shows the frequency of mutant spots observed in the marked trans-heterozygous (MH) and the balancer heterozygous (BH) descendents, of the standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses, treated with different concentrations of (+) – UA (5, 10 or 20 mM), positive control (urethane 10 mM) and negative control (1% Tween-80 and 3% ethanol in ultrapure water).

As expected, the positive control (URE) induced positive results in both crosses (ST and HB) in relation to the negative control. The results for the ST cross showed that the concentrations 5, 10 and 20 mM of UA produced a positive result compared to the negative control.

In the HB cross, a positive result was only found for the UA lowest concentration (5 mM). The concentrations 10 and 20 mM presented a negative result, besides being toxic doses, as shown in **Fig. 2**.

When positive results was observed in the MH descendents, the correspondent BH descendents were also analyzed to check and quantify the

contribution of mutagenic and recombinogenic events to the final observed genotoxicity (Graf et al., 1992).

In the results for BH individuals of the ST cross one can see, based on the frequencies found, that the spots were induced primarily due to the recombinogenic action of the concentrations of UA. The results obtained in the MH individuals of the HB cross, treated with 5 mM of UA showed that this concentration expressed a rate of 46.55% of recombination.

The recombinogenic activity was calculated based on the clone induction frequency per 105 cells. Frequency of mutation (FM) = frequency of clones in BH flies/frequency of clones in MH flies. Frequency of recombination (FR) = 1 – frequency of mutation (FM). Frequencies of total spots (FT) = total spots observed in MH flies (considering mwh and flr<sup>3</sup> spots)/number of flies (Santos et al., 1999; Sinigaglia et al., 2004, 2006).

### 3.2 WTS

To determine whether the changes in the DNA, induced by the UA, are not only involved in mutagenic and recombinogenic activity, but also related to the formation of tumors, a test to detect epithelial tumor clones (*wts*) was conducted in *D. melanogaster*.

**Table 2** shows the frequency of tumors found in the different segments of the body of *D. melanogaster* treated with the concentrations of UA selected using the dose-response test (5; 10 and 20 mM), positive control (DXR 0.4 mM) and negative control (1% Tween-80 and 3% ethanol in ultrapure water).

The frequency of tumors observed in the heterozygote descendents of *D. melanogaster*, treated with the concentrations of UA show that there was a significant difference ( $p < 0.05$ ) in the concentrations of 5, 10 and 20 mM when compared to the negative control. Note also in **Table 2** that the number of tumors increases as the concentration increases, evincing a dose-dependent result up to the concentration of 10 mM. At the concentration 20 mM there was a reduction in the number of tumors, which may be related to the toxicity of the concentration.

Results presented revealed that in *D. melanogaster* UA, in the concentrations used, shows carcinogenic potential.

#### 4. Discussion

Usnic acid (UA) is considered one of the most important biologically active lichen metabolites (Ingólfssdóttir, 2002), with a variety of pharmacological activities already described. Among the applications of UA we highlight its antitumoral potential, in addition to presenting antibiotic, anti-parasitic, antihistamine and antiviral activity (Cocchietto et al., 2002).

Here, we examined the potential for mutagenicity/recombinogenicity and the carcinogenic potential of UA, using the SMART test and *wts* test on *D. melanogaster*.

In the SMART test UA was capable of inducing both types of damage to DNA, mutation and recombination, though recombination was more pronounced, as shown in **Table 1**.

Mutagenic effect was observed for the concentration 5 mM in the HB cross. Nevertheless, after calculating the percentage of mutagenic or recombinogenic events, the result found shows a rate of 46.55%, for spots induced by recombinogenic effect.

The compound urethane was used as a positive control in both crosses (ST and HB) by inducing mutational events. The rate of recombination was 43.58% in the ST cross and 23.87% for the HB cross. These results are similar to those presented by Reis et al. (2015) and Rezende et al. (2013), where the frequency of mutant clones by urethane in the ST and HB crosses were also higher in comparison to the negative control. This suggests that the induction of spots by URE occurred primarily due to occasional somatic mutations or chromosomal aberrations instead of mitotic recombination.

The increase in total mutant spots in the ST cross individuals treated with 5, 10 or 20 mM of UA was statistically significant, when compared with the negative control. While the HB cross produced spot frequencies in the concentration of 5 mM that were higher than the frequency for the same concentration in the ST cross. This result may be explained by the high levels of metabolic enzymes for cytochrome P450, produced by the lineage *ORR/flr<sup>3</sup>*.

In the higher concentrations (10 and 20 mM) an antagonistic effect was found, when compared to the ST and HB crosses, since in the HB cross the result was negative at these concentrations, which means that the difference observed can be attributed, in part, to the high levels of cytochrome P450,



suggesting that the increase in metabolic capacity maximizes the toxic effect of these doses, since UA showed an inverted dose-response effect in HB individuals.

These results are strongly supported by the results found in the study by Foti et al. (2008) in which UA is extensively metabolized by cytochrome P450 (CYP) in S9 human fractions, microsomes of the liver and primary hepatocytes. When metabolized, they can produce metabolites that range in toxicity, being more or less toxic than the compound (Kijima et al., 2011; Leung et al., 2012; Shi et al., 2011; Xue et al., 2011).

Although the mechanisms of toxicity of UA are not well understood, studies by Yokouchi et al. (2015) and Pramyothin et al. (2004) shown that UA can induce toxicity in hepatocytes and in the miocardial cells of rats. The mechanisms that determine the toxicity are related to the capacity of UA to lead to an increase the production of reactive oxygen species, provoking a weakening of the membrane, resulting in the destruction of mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation.

The inhibition of mitochondrial respiration, in turn, leads to a shortage of adenosine triphosphate (ATP), oxidative stress, depletion of glutathione, lipid peroxidation and finally cell death (Han et al., 2004; Pramyothin et al., 2004). Therefore, these results indicate that the mitochondria are the probable targets for toxicity of UA.

However, other studies, have also revealed that the treatment of hepatocytes in rats with UA may lead to the widening of the endoplasmic reticulum (ER) (Pramyothin et al., 2004), leading to a change in the expression of proteins of the RE in the hepatocytes (Liu et al., 2012) and disturbing the homeostasis of calcium (Chen et al., 2015). These results demonstrate that the endoplasmic reticulum (ER) may be another target of UA, since it is an organelle that executes vital functions by depositing necessary proteins for intracellular signaling (Chen et al., 2015). Therefore, the oxidative stress generated by damage in the ER, may also promote the death of cells (Chen et al., 2014).

Among the biological activities exercised by UA are its pro-oxidant and anti-oxidant actions (Kohlhardt-Floehr et al., 2010). This is due to the fact that this metabolite is characterized as a phenolic compound, which may help

combat oxidative stress by acting as an antioxidant, and at the same time, may unbalance cellular redox state in the pro-oxidant sense, depending on the specific conditions, in other words, cellular environment and quantity of the compound (Halliwell, 2008).

Therefore, the pro-oxidant properties of this compound are susceptible to being responsible for the recombination and mutation found in this study. Since, according to Marnett (2000), the induction of oxidative damage in DNA bases may occur out of its reaction with reactive oxygen species, through direct oxidation of nucleic acids or, many times, through the formation of breaks in the DNA molecule.

As a consequence, this damage may produce mutagenic and recombinogenic effects in the cell (de Boer and Hoeijmakers, 2000), since according to Bishop and Schiestl (2000) homologous recombination can result in a loss of heterozygosity or genetic rearrangement. In this way, somatic mutation and recombination serve as an indicator of carcinogenesis.

Carcinogenesis was evaluated in the present study using the *wts* test, which is capable of evaluating the presence of epithelial tumor clones in *D. melanogaster*. The results found for the concentrations of 5, 10 and 20 mM of UA were positive for the presence of tumors when compared with the negative control. However, at the highest concentration (20 mM), we observed the high toxicity of UA, since the number of individuals obtained was very low and the number of tumors observed was considerably reduced, when compared to the other concentrations.

What is seen in the literature for studies conducted with AU is a series of results that show the antiproliferative activity of the substance. As shown by Bazin et al. (2008), in an *in vitro* study, which presents strong cytotoxicity in human cancer cells, in addition to inducing apoptosis in leukemia cells. Similar data were generated by Cardarelli et al. (1997) which prove the efficacy of UA with regard to antiproliferative action in human leukemia lineages (k- 562).

However, the antiproliferative action of UA in these studies is demonstrated by its capacity to generate apoptosis. As determined by microscopic evaluation of the nuclei of the stained cells in the study by Bazin et al. (2008), which confirmed the induction of apoptosis, by measuring caspase-3 in activity in L1210 cells, treated for 48 h with UA.

This study can be directly compared with the results found for the concentration of 20 mM of UA in the evaluation of epithelial tumors in *D. melanogaster*, where a reduction in the number of tumors was observed, probably due to the action of the apoptosis generated by the UA on the imaginal disc cells.

These results are important, since they more clearly define the recombinogenic potential of UA by SMART. As well as the possible contribution of this event in the carcinogenesis also detected in *D. melanogaster* by the *wts* test.

The results observed in this work allow us to conclude that, under the experimental conditions used, UA, a secondary lichen metabolite, has mutagenic and recombinogenic effects on somatic cells of *D. melanogaster*, both in the presence and absence of metabolic activation by the P450 enzymatic system, as well as a carcinogenic effect on the epithelial cells of *D. melanogaster*.

## 5. Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Universidade de Franca (UNIFRAN), Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) and Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

## 6. Conflict of interest

The authors did not report any conflict of interest.

## 7. References

- Akmoutsou, P., Mademtzoglou, D., Nakou, I., Onoufriadis, A., Papadopoulou, X., Kounatidis, I., Frantzios, G., Papadakis, G., Vasiliadis, K., Papadopoulos, N.T., Mavragani-Tsipidou, P., 2011. Evaluation of toxicity and genotoxic effects of spinosad and deltamethrin in *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae*. *Pest. Manag. Sci.* 67, 1534-1540.  
<https://doi.org/10.1002/ps.2208>

- Andrade, H.H.R. de; Lehmann, M., 2003. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*. In: Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. *Mutagênese Ambiental* 11, 281-307.
- Bačkorová, M., Bačkor, M., Mikeš, J., Jendželovský, R., Fedoročko, P., 2011. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol. In Vitro* 25, 37-44.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.004>
- Bazin, M.A., Le Lamer, A.C., Delcros, J.G., Rouaud, I., Uriac, P., Boustie, J., Corbel, J.C., Tomasi, S., 2008. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 6860-6866.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.069>
- Bézivin, C., Tomasi, S., Rouaud, I., Delcros, J.G., Boustie, J., 2004. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*. *Planta Med.* 70, 874-877.  
<https://doi.org/10.1055/s-2004-827240>
- Bishop, A.J.R., Schiestl, R.H., 2002. Homologous recombination and its role in carcinogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2, 75-85.  
<https://doi.org/10.1155/S1110724302204052>
- Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F., Verotta, L., 2009. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Med.* 75, 607-613.  
<https://doi.org/10.1055/s-0029-1185329>
- Campanella, L., Delfini, M., Ercole, P., Iacoangeli, A., Risuleo, G., 2002. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. *Biochimie* 84, 329-334.  
[https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01386-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01386-X)
- Cardarelli, M., Serino, G., Campanella, L., Ercole, P., De Cicco Nardone, F., Alesiani, O., Rossiello, F., 1997. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cell Mol. Life Sci.* 53, 667-672.  
<https://doi.org/10.1007/s000180050086>
- Chen, S., Xuan, J., Couch, L., Iyer, A., Wu, Y., Li, Q.Z., Guo, L., 2014. Sertraline induces endoplasmic reticulum stress in hepatic cells. *Toxicology* 322, 78-88.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.05.007>
- Chen, S., Zhang, Z., Wu, Y., Shi, Q., Yan, H., Mei, N., Tolleson, W.H., Guo, L., 2015. Endoplasmic reticulum stress and store-operated calcium entry contribute to usnic acid-induced toxicity in hepatic cells. *Toxicol. Sci.* 146, 116-126.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv075>

- Cocchietto, M., Skert, N., Nimis, P.L., Sava, G., 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 89, 137-146.  
<https://doi.org/10.1007/s00114-002-0305-3>
- de Boer, J., Hoeijmakers, J.H., 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453-460.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.453>
- Einarsdóttir, E., Groeneweg, J., Björnsdóttir, G.G., Harethardottir, G., Omarsdóttir, S., Ingólfssdóttir, K., Ogmundsdóttir, H.M., 2010. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med.* 76, 969-974.  
<https://doi.org/10.1055/s-0029-1240851>
- Fernández-Moriano, C., Divakar, P.K., Crespo, A., Gómez-Serranillos, M.P., 2015. Neuroprotective activity and cytotoxic potencial of two Parmeliaceae lichens: Identification of active compounds. *Phytomedicine* 22, 847-855.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.06.005>
- Foti, R.S., Dickmann, L.J., Davis, J.A., Greene, R.J., Hill, J.J., Howard, M.L., Pearson, J.T., Rock, D.A., Tay, J.C., Wahlstrom, J.L., Slatter J.G., 2008. Metabolism and related human risk factors for hepatic damage by usnic acid containing nutritional supplements. *Xenobiotica* 38, 264-280.  
<https://doi.org/10.1080/00498250701802514>
- Frei, H., Würigler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297-308.  
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(88\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0165-1161(88)90019-2)
- Frei, H., Würigler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334, 247-258.  
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90018-7)
- Frölich, A., Würigler, F.E., 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* 216, 179-187.  
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(89\)90003-4](https://doi.org/10.1016/0165-1161(89)90003-4)
- Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A.J., Würigler, F.E., 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222, 359-373.  
[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(89\)90112-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(89)90112-2)
- Graf, U., Heo, O.-S., Olvera Ramirez, O., 1992. The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutat. Res.* 266, 197-203.  
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(92\)90187-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(92)90187-7)

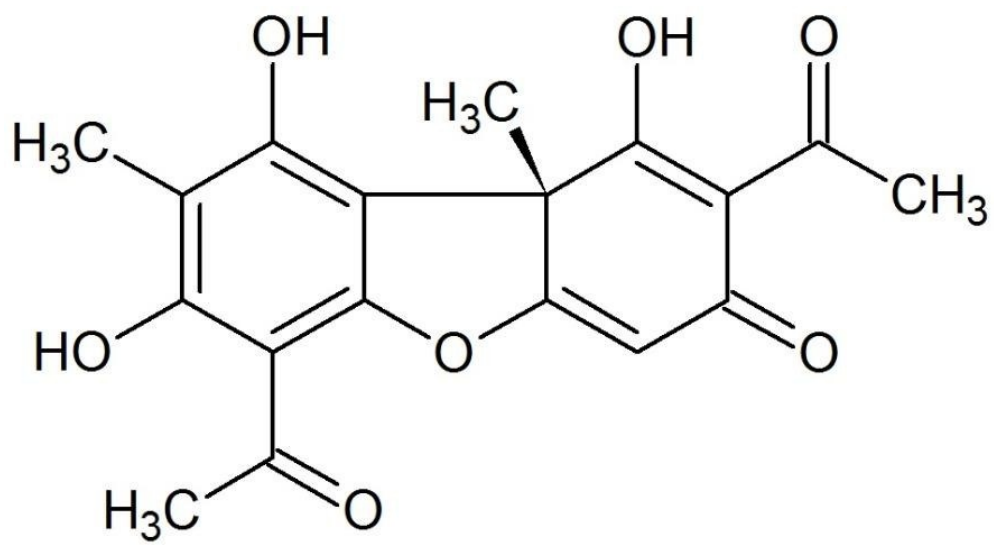
- Graf, U., van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, 59-67.  
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90032-H](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90032-H)
- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188.  
<https://doi.org/10.1002/em.2860060206>
- Halliwell, B., 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 107-112.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.028>
- Han, D., Matsumaru, K., Rettori, D., Kaplowitz, N., 2004. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 67, 439-451.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.09.032>
- Ingólfssdóttir, K., 2002. Usnic acid. *Phytochemistry* 61, 729-736.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)
- Johnson, C.J., Bennett, J.P., Biro, S.M., Duque-Velasquez, J.C., Rodriguez, C.M., Bessen, R.A., Rocke T.E., 2011. Degradation of the disease-associated prion protein by a serine protease from lichens. *PLoS One* 6, 0019836.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019836>
- Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527-549.  
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(70\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(70)90038-2)
- Kijima, T., Shimizu, T., Nonen, S., Furukawa, M., Otani, Y., Minami, T., Takahashi, R., Hirata, H., Nagatomo, I., Takeda, Y., Kida, H., Goya, S., Fujio, Y., Azuma, J., Tachibana, I., Kawase, I., 2011. Safe and successful treatment with erlotinib after gefitinib-induced hepatotoxicity: difference in metabolism as a possible mechanism. *J. Clin. Oncol.* 29, 588-590.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.3368>
- Kohlhardt-Floehr, C., Boehm, F., Troppens, S., Lademann, J., Truscott, T.G., 2010. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation - Studies on human cells. *J. Photochem. Photobiol. B:* 101, 97-102.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.06.017>
- Koparal, A.T., Tüylü, B.A., Türk, H., 2006. In vitro cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their

- non-genotoxicity on human lymphocytes. *Nat. Prod. Lett.* 20, 1300- 1307.  
<https://doi.org/10.1080/14786410601101910>
- Kristmundsdóttir, T., Aradóttir, H.A., Ingólfssdóttir, K., Ogmundsdóttir, H.M., 2002. Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1447-1452.  
<https://doi.org/10.1211/002235702225>
- Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T., Marre, R., 1995. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2541-2543.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.39.11.2541>
- Leandro, L.F., Munari, C.C., Sato, V.L., Alves, J.M., de Oliveira, P.F., Mastrocola, D.F., Martins, S.P., Moraes, T.S., de Oliveira, A.I., Tozatti, M.G., Cunha, W.R., Tavares, D.C., 2013. Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays. *Mutat. Res.* 753, 101-106.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.03.006>
- Leung, L., Kalgutkar, A.S., Obach, R.S., 2012. Metabolic activation in drug- induced liver injury. *Drug Metab. Rev.* 44, 18-33.  
<https://doi.org/10.3109/03602532.2011.605791>
- Liu, Q., Zhao, X., Lu, X., Fan, X., Wang, Y. 2012. Proteomic study on usnic- acid-induced hepatotoxicity in rats. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7312-7317.  
<https://doi.org/10.1021/jf2046834>
- Marnett, L.J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361- 370.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.361>
- Martins, M.C., Silva, M.C., Silva, L.R., Lima, V.L., Pereira, E.C., Falcão, E.P., Melo, A.M., da Silva, N.H., 2014. Usnic acid potassium salt: an alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *PLoS One* 9, e111102.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111102>
- Mayer, M., O'Neill, M.A., Murray, K.E., Santos-Magalhães, N.S., Carneiro-Leão, A.M., Thompson, A.M., Appleyard, V.C., 2005. Usnic acid: a non- genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anticancer Drugs* 16, 805-809.  
<https://doi.org/10.1097/01.cad.0000175588.09070.77>
- Perry, N.B., Benn, M.H., Brennan, N.J., Burgess, E.J., Ellis, G., Galloway, D.J., Lorimer, S.D., Tangney, R.S., 1999. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *The Lichenologist* 31, 627-636.  
<https://doi.org/10.1006/lich.1999.0241>
- Polat, Z., Aydın, E., Türkez, H., Aslan, A., 2016. In vitro risk assessment of usnic acid.

- Pramyothin, P., Janthasoot, W., Pongnimitprasert, N., Phrukudom, S., Ruangrunsi, N., 2004. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *J. Ethnopharmacol.* 90, 381-387.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.10.019>
- Reis, E.M., Rezende, A.A.A., Santos, D.V., Oliveira, P.F., Nicolella, H.D., Tavares, D.C., Silva, A.C.A., Dantas, N.O., Spanó, M.A., 2015. Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the in vitro micronucleus test and the in vivo wing somatic mutation and recombination test. *Food Chem. Toxicol.* 84, 55-63.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.07.008>
- Ren, M.R., Hur, J.S., Kim, J.Y., Park, K.W., Park, S.C., Seong, C.N., Jeong, I.Y., Byun, M.W., Lee, M.K., Seo, K.I., 2009. Anti-proliferative effects of *Lethariella zahlbruckneri* extracts in human HT-29 human colon cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2157-2162.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.042>
- Rezende, A.A.A., Munari, C.C.; de Oliveira, P.F., Ferreira, N.H., Tavares, D.C., Silva, M.L.A., Rezende, K.C., Spanó, M.A., 2013. A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. *Food Chem. Toxicol.* 55, 645-652.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.050>
- Santos, J.H., Graf, U., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 1999. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 444, 355-365.  
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00101-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00101-1)
- Shi, Q., Yang, X., Greenhaw, J., Salminen, W.F., 2011. Hepatic cytochrome P450s attenuate the cytotoxicity induced by leflunomide and its active metabolite A77 1726 in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 122, 579-586.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr106>
- Sidorov, R.A., Ugnivenko, E.G., Khovanova, E.M., Belitsky, G.A., 2001. Induction of tumor clones in *D. melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogens. *Mutat. Res.* 498, 181-191.  
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00277-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00277-7)
- Sinigaglia, M., Lehmann, M., Baumgardt, P., do Amaral, V.S., Dihl, R.R., Reguly, M.L., de Andrade, H.H., 2006. Vanillin as a modulator agent in SMART test: inhibition in the steps that precede N-methyl-N-nitrosourea-, N-ethyl-N-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin- genotoxicity. *Mutat. Res.* 607, 225-230.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.04.012>

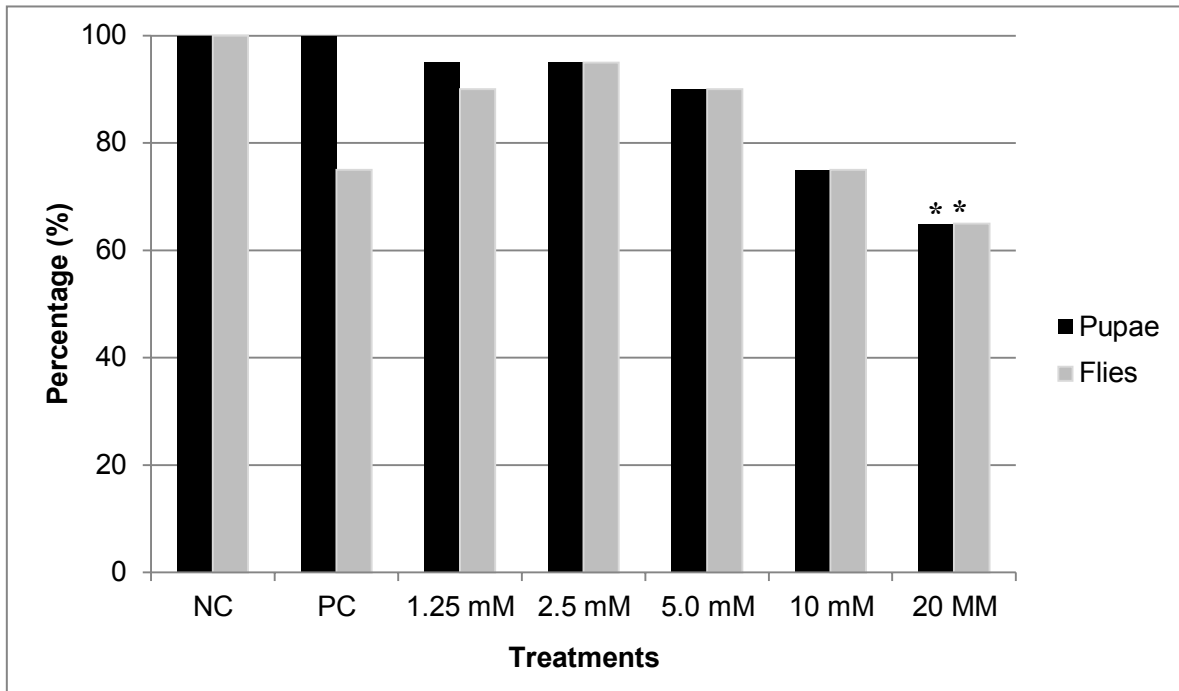


- Sinigaglia, M., Reguly, M.L., de Andrade, H.H., 2004. Effect of vanillin on toxicant-induced mutation and mitotic recombination in proliferating somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 44, 394-400.  
<https://doi.org/10.1002/em.20067>
- Tao, W., Zhang, S., Turenchalk, G.S., Stewart, R.A., St John, M.A., Chen, W., Xu, T., 1999. Human homologue of the *Drosophila melanogaster* lats tumour suppressor modulates CDC2 activity. *Nat. Genet.* 21, 177-181.  
<https://doi.org/10.1038/5960>
- Vijayakumar, C.S., Viswanathan, S., Reddy, M.K., Parvathavarthini, S., Kundu, A.B., Sukumar, E., 2000. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia* 71, 564-566.  
[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00209-4](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00209-4)
- Xue, X., Gong, L., Qi, X., Wu, Y., Xing, G., Yao, J., Luan, Y., Xiao, Y., Li, Y., Wu, X., Chen, M., Gu, J., Ren, J., 2011. Knockout of hepatic P450 reductase aggravates triptolide-induced toxicity. *Toxicol. Lett.* 205, 47-54.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.05.003>
- Yokouchi, Y., Imaoka, M., Niino, N., Kiyosawa, N., Sayama, A., Jindo, T., 2015. (+)-Usnic acid-induced myocardial toxicity in rats. *Toxicol. Pathol.* 43, 424-434.  
<https://doi.org/10.1177/0192623313504308>

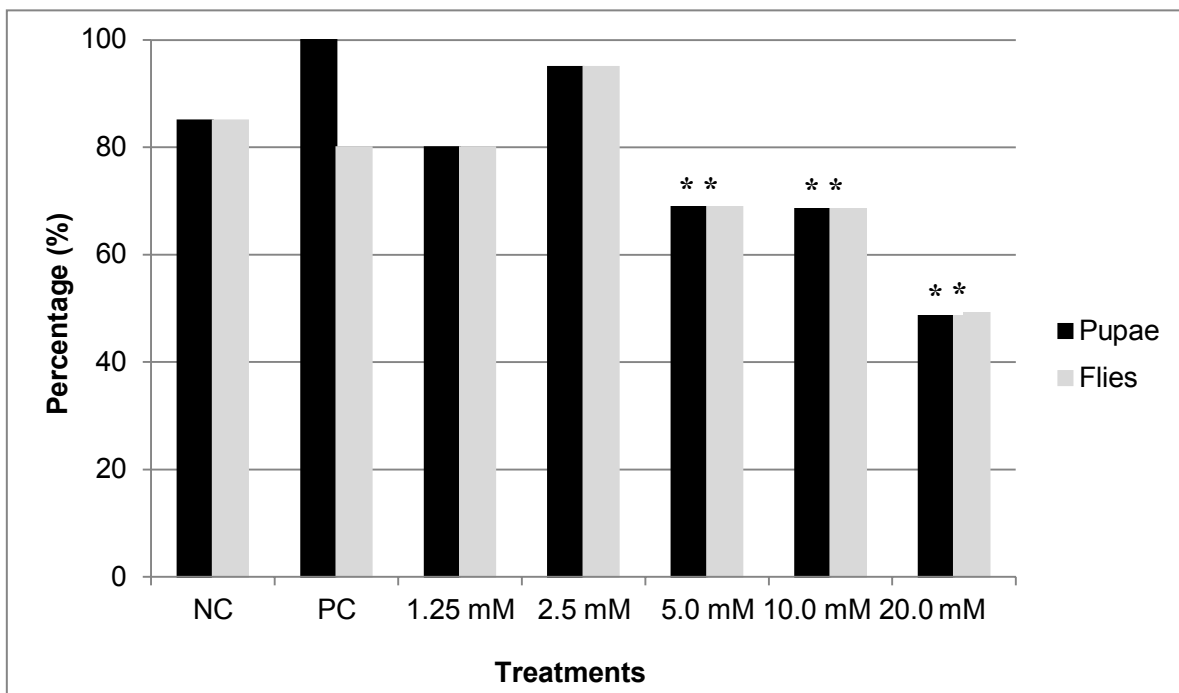


**Fig. 1.** Structural formula of (+)- usnic acid.

### A. Standard cross



### B. High bioactivation cross (HB)



**Fig 2.** Survival rates upon exposure to different concentrations (1.25, 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 mM) of usnic acid, and positive control (PC) urethane (10.0 mM) relative to negative control (NC) (1% Tween-80 and 3% ethanol in distilled water) in the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *D. melanogaster*. A: Standard cross; B: High bioactivation cross. Statistical comparisons of survival rates were made by using Chi-square test for ratios for independent samples. \*Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

**Table 1:** Summary of results obtained in the marked trans-heterozygous descendants (MH) and balancer-heterozygous (BH) of *Drosophila melanogaster* derived from the standard cross (ST) and high bioactivation cross (HB) treated with different concentrations of the usnic acid (UA), positive control (URE) (Urethane 10mM) and negative control (Tween-80 and 3% ethanol in distilled water).

Treatments (mM)	N <sup>o</sup> . of flies (N)	Spots per fly (n <sup>o</sup> . of spots) statistical diagnosis <sup>a</sup>				Spots with <i>mwh</i> clone <sup>c</sup> (n)	Mean clone size class <sup>c,d</sup> (i)	Frequency of formation / 10 <sup>5</sup> cells per cells division <sup>d</sup>		Recombination (%)					
		Small single (1-2 cels) <sup>b</sup>		Large single (>2 cels) <sup>b</sup>				Observed	Control corrected						
		m = 2	m = 5	m = 5	Total spots m = 2										
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>															
Cross ST															
Negative control	60	0.30 (18)		0.03 (2)		0.00 (0)		0.33 (20)		20	1.50		0.68		
Positive control	60	1.47 (88)	+	0.13 (8)	i	0.10 (6)	+	1.70 (102)	+	100	1.58 {1.60}		3.42	2.73	43.58
UA 5.0	60	0.48 (29)	i	0.08 (5)	i	0.05 (3)	i	0.62 (37)	+	37	2.19 {3.00}		1.26	0.58	55.55
UA 10.0	60	0.60 (36)	+	0.03 (2)	i	0.03 (2)	i	0.67 (40)	+	40	1.68 {1.85}		1.37	0.68	64.70
UA 20.0	60	0.43 (26)	i	0.12 (7)	i	0.03 (2)	i	0.58 (35)	+	35	2.00 {2.67}		1.20	0.51	68.62
Cross HB															
Negative control	60	0.42 (25)		0.07 (4)		0.03 (2)		0.52 (31)		31	1.71		1.06		
Positive control	60	7.07 (424)	+	1.12 (67)	+	0.50 (30)	+	8.68 (521)	+	513	1.81 {1.82}		17.52	16.46	23.87
UA 5.0	60	0.65 (39)	i	0.13 (8)	i	0.02 (1)	i	0.80 (48)	+	48	1.77 {1.88}		1.64	0.58	46.55
UA 10.0	30	0.57 (17)	i	0.03 (1)	i	0.00 (0)	i	0.60 (18)	-	18	1.83 {2.60}		1.23	-0.89	
UA 20.0	30	0.40 (12)	-	0.03 (1)	i	0.07 (2)	i	0.50 (15)	-	15	1.87 {-3.00}		1.02	-0.03	
<i>mwh/TM3</i>															
Cross ST															
Negative control	60	0.28 (17)		0.00 (0)				0.28 (17)		17	1.29		0.58		
Positive control	60	1.02 (61)	+	0.02 (1)	i			1.03 (62)	+	62	1.31 {1.31}		2.12	1.54	
UA 5.0	60	0.38 (23)	i	0.02 (1)	i			0.40 (24)	-	24	1.29 {1.29}		0.82	0.24	
UA 10.0	60	0.40 (24)	i	0.00 (0)	i			0.40 (24)	-	24	1.25 {1.14}		0.82	0.24	
UA 20.0	50	0.36 (18)	i	0.00 (0)	i			0.36 (18)	-	18	1.28 {1.22}		0.74	0.16	
Cross HB															
Negative control	60	0.63 (38)		0.02 (1)				0.65 (39)		39	1.23		1.33		
Positive control	60	6.52 (391)	+	0.25 (15)	+			6.77 (406)	+	406	1.32 {1.33}		13.87	12.53	
UA 5.0	60	0.98 (59)	+	0.08 (5)	i			1.07 (64)	+	64	1.36 {1.56}		2.19	0.85	

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr<sup>3</sup>*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

<sup>a</sup> Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988, 1995): +, positive; -, negative; i, inconclusive. *m* = multiplication factor for significantly negative results. Level of significance *p* ≤ 0.05.

<sup>b</sup> Including rare *flr<sup>3</sup>* single spots.

<sup>c</sup> Considering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

<sup>d</sup> Frequency of clone formation: clones/fly/48,800 cells (without size correction) Frei et al. (1992).

<sup>e</sup> Calculated as [(URE alone - URE + UA) / URE] x 100, according to Abraham (1994)

<sup>f</sup> Only *mwh* single spots can be observed in heterozygous individuals *mwh/TM3*, since the balancer chromosome TM3 does not contain the mutant gene *flr<sup>3</sup>*.

**Table 2.** Tumor clone frequency observed in *Drosophila melanogaster* heterozygote for the wts tumor suppressor gene, treated with different usnic acid (UA) concentrations, positive control (Doxorubicin – DXR) and negative control.

Treatment		Number of tumors analyzed						
(mM)	Number of flies	Eye	Head	Wing	Body	Leg	Halter	Total
Negative control	200	0.00 (00)	0.00 (00)	0.00 (00)	0.02 (04)	0.00 (00)	0.00 (00)	0.02 (04)
Positive control	200	0.38 (77)	0.35 (71)	1.51 (303)	1.20 (241)	0.40 (80)	0.14 (28)	4.00 (800)*
UA 5,0	200	0.005 (01)	0.01 (02)	0.02 (04)	0.03 (06)	0.005 (01)	0.00 (00)	0.07 (14)*
UA 10,0	200	0.00 (00)	0.015 (03)	0.025 (05)	0.06 (12)	0.00 (00)	0.005 (01)	0.10 (21)*
UA 20,0	42	0.00 (00)	0.00 (00)	0.03 (06)	0.015 (03)	0.00 (00)	0.00 (00)	0.04 (09)*

Statistical diagnosis according to the Mann–Whitney Test. Level of significance  $P < 0.05$ .

DXR, Doxorubicin.

\* Value consider different from the negative control ( $p < 0.05$ ).

---

---

# **CONCLUSÕES GERAIS**

---

---

## Conclusões gerais

Em conclusão, a estratégia experimental utilizada neste trabalho permitiu evidenciar que o AU apresentou efeitos moduladores sobre efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos de diferentes agentes químicos *in vivo* e *in vitro*. Tal efeito é demonstrado por meio dos resultados observados em ensaios com *Drosophila melanogaster*, que demonstraram efeito recombinogênico e mutagênico em células somáticas, tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica pelo sistema enzimático citocromo P-450 no teste SMART, bem como efeito carcinogênico em células epitéliais avaliadas pelo teste WTS. Ao mesmo tempo observou-se, que o AU apresentou efeito protetor sobre as lesões pré-neoplásicas induzidas pelo carcinógeno DMH em cólon de ratos, e efeito modulador sobre os danos ao DNA induzidos pela DXR no teste CBMN.

Estes resultados podem ser atribuídos às propriedades antioxidantes e pró-oxidantes do AU, por acreditar que este composto fenólico seja capaz de reduzir o estresse oxidativo, atuando como antioxidante e, ainda, desequilibrando o estado redox celular, o que denota sua ação pró-oxidante.

Sugere-se, portanto, que novos estudos, envolvendo outros organismos testes e modelos experimentais, sejam conduzidos com o intuito de promover maior compreensão sobre as atividades biológicas desse ácido liquênico.

---

---

# APÊNDICE

---

---



Frequências de micronúcleos (MNs) em células binucleadas (CBN) e índices de divisão nuclear (IDN) obtidos em células CHO tratadas com diferentes concentrações de ácido úsnico e/ou doxorubicina, e seus respectivos controles.

AU – Ácido Úsnico; DXR – Doxorubicina (0,5 µg/mL); DMSO - dimetilsulfóxido (0,02%).

Tratamentos µg/mL	Frequência de MNs em CBNs <sup>a</sup>				Total	IDN <sup>b</sup>
	1	2	3	4		
<b>Controle</b>	6	0	0	0	6	1,65
	8	0	0	0	8	1,62
	5	0	0	0	5	1,70
<b>DMSO</b>	7	1	0	0	9	1,62
	5	0	0	0	5	1,69
	7	0	0	0	7	1,65
<b>AU 7,5</b>	4	0	0	0	4	1,50
	9	1	0	0	11	1,55
	10	0	0	0	10	1,55
<b>AU 15</b>	11	0	0	0	11	1,55
	5	0	0	0	5	1,60
	8	0	0	0	8	1,60
<b>AU 30</b>	16	1	0	0	18	1,62
	15	0	0	0	15	1,63
	12	0	0	0	12	1,60
<b>DXR</b>	20	1	0	0	22	1,62
	22	0	0	0	22	1,63
	22	1	0	0	24	1,70
<b>DMSO + DXR</b>	19	0	0	0	19	1,75
	17	0	0	0	17	1,68
	19	0	0	0	19	1,70
<b>AU 3,75 + DXR</b>	16	0	0	0	16	1,60
	9	0	0	0	9	1,57
	14	0	0	0	14	1,60
<b>AU 7,5 + DXR</b>	14	0	0	0	14	1,64
	8	1	0	0	10	1,57
	12	0	0	0	12	1,60
<b>AU 15 + DXR</b>	23	2	0	0	27	1,64
	23	1	1	0	28	1,65
	21	2	0	0	25	1,50

<sup>a</sup>Análise de 1000 células binucleadas por repetição.

<sup>b</sup>Análise de 500 células por repetição.